

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/EP05/002449

International filing date: 04 March 2005 (04.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: EP
Number: 04090086.2
Filing date: 05 March 2004 (05.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 06 April 2005 (06.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



**Europäisches
Patentamt**

**European
Patent Office**

**Office européen
des brevets**

Bescheinigung

Certificate

Attestation

Die angehefteten Unterlagen stimmen mit der ursprünglich eingereichten Fassung der auf dem nächsten Blatt bezeichneten europäischen Patentanmeldung überein.

The attached documents are exact copies of the European patent application described on the following page, as originally filed.

Les documents fixés à cette attestation sont conformes à la version initialement déposée de la demande de brevet européen spécifiée à la page suivante.

Patentanmeldung Nr. Patent application No. Demande de brevet n°

04090086.2

Der Präsident des Europäischen Patentamts;
Im Auftrag

For the President of the European Patent Office

Le Président de l'Office européen des brevets
p.o.

R C van Dijk



Anmeldung Nr:
Application no.: 04090086.2
Demande no:

Anmeldetag:
Date of filing: 05.03.04
Date de dépôt:

Anmelder/Applicant(s)/Demandeur(s):

Bayer CropScience GmbH
Brüningstrasse 50
65929 Frankfurt/Main
ALLEMAGNE

Bezeichnung der Erfindung/Title of the invention/Titre de l'invention:
(Falls die Bezeichnung der Erfindung nicht angegeben ist, siehe Beschreibung.
If no title is shown please refer to the description.
Si aucun titre n'est indiqué se référer à la description.)

Pflanzen mit erhöhter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden Enzyms

In Anspruch genommene Priorität(en) / Priority(ies) claimed / Priorité(s)
revendiquée(s)

-----Staat/Tag/Aktenzeichen/State/Date/File no./Pays/Date/Numéro-de-dépôt:-----

Internationale Patentklassifikation/International Patent Classification/
Classification internationale des brevets:

A01H/

Am Anmeldetag benannte Vertragstaaten/Contracting states designated at date of
filing/Etats contractants désignées lors du dépôt:

AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HU IE IT LU MC NL
PL PT RO SE SI SK TR LI

Bayer CropScience GmbH

05.07.2004

05-03-2004

Pflanzen mit erhöhter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden

5 Enzyms

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines
10 Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den
15 erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuren, codierend Stärke phosphorylierende OK1 Proteine, sowie Vektoren, Wirtszellen, Pflanzenzellen und
20 Pflanzen enthaltend solche Nucleinsäuremoleküle. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung OK1 Proteine, die eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweisen.

Im Hinblick auf die zunehmende Bedeutung, die pflanzlichen Inhaltsstoffen als erneuerbaren Rohstoffquellen zur Zeit beigemessen wird, ist es eine der Aufgaben
25 der biotechnologischen Forschung, sich um eine Anpassung dieser pflanzlichen Rohstoffe an die Anforderungen der verarbeitenden Industrie zu bemühen. Um eine Anwendung von nachwachsenden Rohstoffen in möglichst vielen Einsatzgebieten zu ermöglichen, ist es darüber hinaus erforderlich, eine große Stoffvielfalt zu erreichen.

30 Das Polysaccharid Stärke ist aus chemisch einheitlichen Grundbausteinen, den Glucosemolekülen, aufgebaut, stellt jedoch ein komplexes Gemisch

unterschiedlicher Molekülformen dar, die Unterschiede hinsichtlich des Polymerisations- und des Verzweigungsgrades aufweisen und sich somit in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften stark voneinander unterscheiden. Man differenziert zwischen Amylosestärke, einem im Wesentlichen unverzweigten
5 Polymer aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften Glucoseeinheiten, und der Amylopektinstärke, einem verzweigten Polymer, bei dem die Verzweigungen durch das Auftreten zusätzlicher alpha-1,6-glycosidischer Verknüpfungen zustande kommen. Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen Amylose und Amylopektin liegt im Molekulargewicht. Während Amylose, je nach Herkunft der Stärke, ein
10 Molekulargewicht von $5 \times 10^5 - 10^6$ Da besitzt, liegt das des Amylopektins zwischen 10^7 und 10^8 Da. Die beiden Makromoleküle können durch ihr Molekulargewicht und ihre unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften differenziert werden, was am einfachsten durch ihre unterschiedlichen Jodbindungseigenschaften sichtbar gemacht werden kann.

15 Amylose wurde lange als lineares Polymer, bestehend aus alpha-1,4-glycosidisch verknüpften alpha-D-Glucose-Monomeren, angesehen. In neueren Studien wurde jedoch die Anwesenheit von alpha-1,6-glycosidischen Verzweigungspunkten (ca. 0,1%) nachgewiesen (Hizukuri und Takagi, Carbohydr. Res. 134, (1984), 1-10;
20 Takeda et al., Carbohydr. Res. 132, (1984), 83-92).

Die funktionellen Eigenschaften, wie z.B. die Löslichkeit, das Retrogradationsverhalten, das Wasserbindevermögen, die Filmbildungseigenschaften, die Viskosität, die Verkleisterungseigenschaften, die
25 Gefrier-Tau-Stabilität, die Säurestabilität, die Gelfestigkeit, die Stärkekorngröße von Stärken werden u.a. durch das Amylose/Amylopektin-Verhältnis, das Molekulargewicht, das Muster der Seitenkettenverteilung, den Gehalt an Ionen, den Lipid- und Proteingehalt, die mittlere Stärkekorngröße die Stärkekornmorphologie etc. beeinflusst. Die funktionellen Eigenschaften von Stärke werden auch vom
30 Phosphatgehalt, einer nicht-Kohlenstoffkomponente von Stärke, beeinflusst. Dabei ist zwischen Phosphat, welches in Form von Monoestern kovalent an die Glucosemoleküle der Stärke gebundenen ist (im Folgenden als Stärkephosphat

bezeichnet) und Phosphat in Form von mit der Stärke assoziierten Phospholipiden zu unterscheiden.

Der Gehalt an Stärkephosphat variiert je nach Pflanzensorte. So synthetisieren z.B. bestimmte Maismutanten eine Stärke mit erhöhtem Gehalt an Stärkephosphat (waxy-Mais 0,002% und Hoch-Amylose-Mais 0,013%), während herkömmliche Mais Sorten nur Spuren von Stärkephosphat aufweisen. Ebenfalls geringe Mengen an Stärkephosphat findet man in Weizen (0,001%) während in Hafer und Sorghum kein Stärkephosphat nachgewiesen werden konnte. In Reis-Mutanten wurde ebenfalls weniger Stärkephosphat gefunden (waxy-Reis 0,003%), als in herkömmlichen Reissorten (0,013%). Signifikante Mengen von Stärkephosphat wurden in Knollen- oder Wurzelspeichestärke synthetisierenden Pflanzen wie z.B. Tapioca (0,008%), Süßkartoffel (0,011%), Pfeilwurz (0,021%) oder Kartoffel (0,089%) nachgewiesen. Die im Vorangegangenen zitierten prozentualen Werte für den Stärkephosphatgehalt beziehen sich jeweils auf das Trockengewicht der Stärke und sind von Jane et al. (1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832) ermittelt worden.

Stärkephosphat kann in Form von Monoestern an der C-2, C-3 oder C-6 Position der polymerisierten Glucosemonomere vorliegen (Takeda und Hizukuri, 1971, Starch/Stärke 23, 267-272). Die Phosphatverteilung des Phosphates in von Pflanzen synthetisierter Stärke zeichnet sich im Allgemeinen dadurch aus, dass etwa 30% bis 40% der Phosphatreste in C-3-Position und etwa 60% bis 70% der Phosphatreste in C-6-Position der Glucosemoleküle kovalent gebunden sind (Blennow et al., 2000, Int. J. of Biological Macromolecules 27, 211-218). Blennow et al. (2000, Carbohydrate Polymers 41, 163-174) ermittelten einen Gehalt an Stärkephosphat, der in C-6 Position der Glukosemoleküle gebunden ist, für verschiedene Stärken, wie z.B. Kartoffelstärke (zwischen 7,8 und 33,5 nMol pro mg Stärke, je nach Sorte), Stärke aus verschiedenen *Curcuma* Spezies (zwischen 1,8 und 63 nMol pro mg), Tapiocastärke (2,5 nMol pro mg Stärke), Reisstärke (1,0 nMol pro mg Stärke), Mungbohnenstärke (3,5 nMol pro mg Stärke) und Sorghumstärke (0,9 nMol pro mg Stärke). In Gerstenstärke und Stärke aus verschiedenen waxy-Mutanten von Mais konnten diese Autoren kein an der C-6-Position gebundenes Stärkephosphat

nachweisen. Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen dem Genotyp einer Pflanze und dem Gehalt von Stärkephosphat hergestellt werden (Jane et al., 1996, Cereal Foods World 41 (11), 827-832). Daher ist es zurzeit nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat in Pflanzen durch züchterische Maßnahmen zu beeinflussen.

5

Bisher ist nur ein Protein beschrieben, welches die Einführung von kovalenten Bindungen von Phosphatresten an die Glucosemoleküle der Stärke vermittelt. Dieses Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer alpha-Glucan-Wasser-Dikinase (GWD, E.C.: 2.7.9.4) (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig als R1 bezeichnet und ist an die Stärkekörner der Speicherstärke in Kartoffelknollen gebunden (Lorberth et al., 1998, Nature Biotechnology 16, 473-477). In der von R1 katalysierten Reaktion werden die Edukte alpha-1,4-Glucan (Stärke), Adenosintriphosphat (ATP) und Wasser zu den Produkten Glucan-Phosphat (Stärkephosphat), Monophosphat und Adenosinmonophosphat umgesetzt. Dabei wird der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser und der beta-Phosphatrest des ATP auf das Glucan (Stärke) übertragen. R1 überträgt *in vitro* den beta-Phosphatrest von ATP auf die C-6- und die C-3-Position der Glucosemoleküle von alpha-1,4-Glucanen. Das Verhältnis von C-6-Phosphat zu C-3 Phosphat, welches bei der *in vitro* Reaktion erhalten wird, entspricht dem Verhältnis, welches in Stärke, isoliert aus Pflanzen, vorliegt (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171). Da das Stärkephosphat in Kartoffelstärke zu etwa 70% in C-6-Position und zu etwa 30% in C-3-Position der Glucosemonomere der Stärke gebunden vorliegt, bedeutet dies, dass R1 bevorzugt die C-6-Position der Glucosemoleküle phosphoryliert. Weiterhin ist für R1 u.a. durch Verwendung von Amylopektin aus Mais gezeigt worden, dass es alpha-1,4-Glucane phosphorylieren kann, welche noch kein kovalent gebundenes Phosphat enthalten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171), d.h. R1 ist in der Lage, Phosphat *de novo* in alpha-1,4-Glucane einführen.

30 Nukleinsäuresequenzen und zu diesen korrespondierende Aminosäuresequenzen, codierend ein R1 Protein sind aus unterschiedlichen Spezies, wie z.B. Kartoffel (WO 97 11188, GenBank Acc.: AY027522, Y09533), Weizen (WO 00 77229, US

6,462,256, GenBank Acc.: AAN93923, GenBank Acc.: AR236165), Reis (GenBank Acc.: AAR61445, GenBank Acc.: AR400814), Mais (GenBank Acc.: AAR61444, GenBank Acc.: AR400813), Soyabohne (GenBank Acc.: AAR61446, GenBank Acc.: AR400815), Citrus (GenBank Acc.: AY094062) und *Arabidopsis* (GenBank Acc.: AF312027) beschrieben.

Weizenpflanzen, welche durch Überexpression eines R1 Gens aus Kartoffel eine erhöhte Aktivität eines R1 Proteins aufweisen, sind in WO 02 34923 beschrieben. Diese Pflanzen synthetisieren im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen, in
10 welchen kein Stärkephosphat detektiert werden konnte, eine Stärke mit signifikanten Mengen an Stärkephosphat in der C-6-Position der Glucosemoleküle.

Weitere Proteine, die eine Reaktion katalysieren, welche kovalent gebundene Phosphatgruppen in die Stärke einführen, sind bisher nicht beschrieben. Auch
15 Enzyme, die bevorzugt Phosphatgruppen in C-3-Position und/oder C-2-Position der Glucosemoleküle von Stärke einführen, sind nicht bekannt. Damit stehen abgesehen von der Erhöhung des Gehaltes an Stärkephosphat in Pflanzen auch keine Möglichkeiten zur Verfügung, die Phosphorylierung von Stärke in Pflanzen gezielt zu beeinflussen, die Phosphatverteilung innerhalb der von Pflanzen synthetisierten
20 Stärke zu verändern und/oder den Gehalt an Stärkephosphat weiter zu erhöhen.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zu Grunde, modifizierte Stärken mit erhöhtem Phosphatgehalt und/oder veränderter Phosphatverteilung sowie neue Pflanzenzellen und/oder Pflanzen, die eine solche modifizierte Stärke synthetisieren,
25 als auch Verfahren und Mittel zur Erzeugung besagter Pflanzen und/oder Pflanzenzellen zur Verfügung zu stellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen bezeichneten Ausführungsformen gelöst.

30

Somit betrifft die vorliegende Erfindung genetisch modifizierte Pflanzenzellen und Pflanzen, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines

OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweisen.

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft eine Pflanzenzelle oder eine
5 Pflanze, die genetisch modifiziert ist, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die genetische Modifikation kann dabei jede genetische Modifikation sein, die zu
10 einer Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins in genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder genetisch modifizierten Pflanzen führt im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen oder Wildtyp-Pflanzen.

15 Der Begriff „Wildtyp-Pflanzenzelle“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzenzellen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzenzellen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle entspricht.

20

Der Begriff „Wildtyp-Pflanze“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass es sich um Pflanzen handelt, die als Ausgangsmaterial für die Herstellung der erfindungsgemäßen Pflanzen dienen, d.h. deren genetische Information, abgesehen von der eingeführten genetischen Modifikation, der einer
25 erfindungsgemäßen Pflanze entspricht.

Der Begriff „entsprechend“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass beim Vergleich von mehreren Gegenständen die betreffenden Gegenstände, die miteinander verglichen werden, unter gleichen Bedingungen
30 gehalten wurden. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung bedeutet der Begriff „entsprechend“ im Zusammenhang mit Wildtyp-Pflanzenzelle oder Wildtyp-Pflanze, dass die Pflanzenzellen oder Pflanzen, die miteinander verglichen werden,

unter gleichen Kulturbedingungen aufgezogen wurden und dass sie ein gleiches (Kultur-) Alter aufweisen.

Der Begriff "erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins" bedeutet dabei im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Erhöhung der Expression endogener Gene, die OK1 Proteine codieren und/oder eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein in den Zellen und/oder eine Erhöhung der enzymatischen Aktivität von OK1 Proteinen in den Zellen.

- 10 Die Erhöhung der Expression kann beispielsweise bestimmt werden durch Messung der Menge an OK1 Protein codierenden Transkripten, z.B. durch Northern-Blot-Analyse oder RT-PCR. Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an Transkripten im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%,
15 bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an Transkripten, codierend ein OK1 Protein, bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbaren Mengen an Transkripten, codierend ein OK1 Protein, aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation nachweisbare Mengen an Transkripten, codierend ein OK1
20 Protein, aufweisen.

- Die Erhöhung der Menge an Protein eines OK1 Proteins, die eine erhöhte Aktivität dieser Proteine in den betreffenden Pflanzenzellen zur Folge hat, kann beispielsweise bestimmt werden durch immunologische Methoden wie Western-Blot-
25 Analyse, ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) oder RIA (Radio Immune Assay). Eine Erhöhung bedeutet dabei vorzugsweise eine Erhöhung der Menge an OK1 Protein im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Zellen um mindestens 50%, insbesondere um mindestens 70%, bevorzugt um mindestens 85% und besonders bevorzugt um mindestens 100%. Eine Erhöhung der Menge an OK1
30 Protein bedeutet auch, dass Pflanzen oder Pflanzenzellen, die keine nachweisbare Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, nach erfindungsgemäßer genetischer Modifikation eine nachweisbare Menge eines OK1 Proteins aufweisen.

Methoden zur Herstellung von Antikörpern, die spezifisch mit einem bestimmten Protein reagieren, d.h. die spezifisch an besagtes Protein binden, sind dem Fachmann bekannt (siehe z.B. Lottspeich und Zorbas (Eds.), 1998, Bioanalytik, Spektrum akad, Verlag, Heidelberg, Berlin, ISBN 3-8274-0041-4). Die Herstellung solcher Antikörper wird von einigen Firmen (z.B. Eurogentec, Belgien) als Auftragservice angeboten. Eine Möglichkeit zur Herstellung von Antikörpern, die mit einem OK1 Protein spezifisch reagieren, ist weiter unten beschrieben (siehe Beispiel 10).

10

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung soll unter dem Begriff „OK 1 Protein“ ein Protein verstanden werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf bereits phosphorylierte Stärke (P-Stärke) überträgt. Stärken, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante weisen keine nachweisbaren Mengen an

15 kovalent gebundenen Phosphatresten auf und werden von einem OK1 Protein nicht phosphoryliert, d.h. ein erfindungsgemäßes OK1 Protein benötigt bereits phosphorylierte Stärke als Substrat zur Übertragung weiterer Phosphatreste.

Bevorzugt wird von einem OK1 Protein der beta-Phosphatrest des ATP auf die Stärke und der gamma-Phosphatrest des ATP auf Wasser übertragen. Als weiteres

20 Reaktionsprodukt entsteht bei einer durch ein OK1 Protein durchgeführten Phosphorylierungsreaktion von P-Stärke AMP (Adenosinmonophosphat). Ein OK1 Protein wird daher als [phosphoryliertes-alpha-Glucan]-Wasser-Dikinase ([P-Glucan]-Wasser-Dikinase) bzw. als [phosphorylierte-Stärke]-Wasser-Dikinase bezeichnet.

Bevorzugt entsteht an der durch ein OK1 Protein phosphorylierten P-Stärke eine
25 zusätzliche Phosphatmonoesterbindung in C-6-Position und/oder in C-3-Position eines Glucosemoleküls der P-Stärke. Besonders bevorzugt entstehen bei der durch ein OK1 Protein katalysierten Phosphorylierung von P-Stärke mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle der betreffenden
30 P-Stärke.

Aminosäuresequenzen, die OK1 Proteine codieren, enthalten eine Phosphohistidindomäne. Phosphohistidindomänen sind z.B. beschrieben bei Tien-

Shin Yu et al. (2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Bevorzugt enthalten Phosphohistidindomänen von OK1 Proteine codierenden Aminosäuren zwei Histidine.

- Bei der Katalyse einer Phosphorylierungsreaktion einer P-Stärke durch ein OK1 Protein entsteht als Zwischenprodukt ein phosphoryliertes OK1 Protein, bei welchem ein Phosphatrest des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden ist. Das Zwischenprodukt entsteht durch Autophosphorylierung des OK1 Proteins, d.h. das OK1 Protein selbst katalysiert die Reaktion, die zu dem Zwischenprodukt führt. Bevorzugt wird durch die Autophosphorylierung ein Histidinrest der Aminosäuresequenz, codierend ein OK1 Protein, phosphoryliert, besonders bevorzugt ein Histidinrest, der Bestandteil einer Phosphohistidindomäne ist. Weiterhin weisen erfindungsgemäße OK1 Proteine eine erhöhte Bindungsaktivität zu P-Stärke auf im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

- Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die P-Stärke als Substrat benötigen, um diese weiter zu phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Dieses ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich. Die Aufklärung der Funktion eines OK1 Proteins und damit die Bereitstellung eines OK1 Proteins führt dazu, dass nun Pflanzen dahingehend genetisch modifiziert werden können, dass sie eine Stärke mit veränderten Eigenschaften synthetisieren. Das Verändern der Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

- Unter dem Begriff „erhöhte Bindungsaktivität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, eine erhöhte Affinität eines Proteins zu einem ersten Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat verstanden werden. D.h., dass die Menge an Protein, die unter gleichen Inkubationsbedingungen vermehrt an ein erstes

Substrat im Vergleich zu einem zweiten Substrat bindet, eine erhöhte Bindungsaktivität zu dem ersten Substrat aufweist.

Unter dem Begriff „Stärkephosphat“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden
5 Erfindung kovalent an die Glucosemoleküle von Stärke gebundene Phosphatgruppen verstanden werden.

Unter dem Begriff „nicht-phosphorylierte-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche keine nachweisbaren
10 Mengen an Stärkephosphat enthält. Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185) beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der
15 Menge an Stärkephosphat mittels ^{31}P -NMR nach der bei Kasemusuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73, 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

Unter dem Begriff „phosphorylierte-Stärke“ oder „P-Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Stärke verstanden werden, welche Stärkephosphat enthält.

20

Nachgewiesen werden kann die Aktivität eines OK1 Proteins z.B. durch *in vitro* Inkubation eines OK1 Proteins unter Verwendung von ATP, welches einen in der beta-Position markierten Phosphatrest enthält (markiertes ATP). Zu bevorzugen ist ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch markiert ist, d.h. bei
25 welchem nur der Phosphatrest in beta-Position eine Markierung trägt. Bevorzugt wird radioaktiv markiertes ATP, besonders bevorzugt ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch radioaktiv markiert ist und insbesondere bevorzugt wird ATP, bei welchem der Phosphatrest in beta-Position spezifisch mit ^{33}P markiert ist, verwendet. Wird ein OK1 Protein mit markiertem ATP und Stärken, welche nicht
30 phosphoryliert sind, inkubiert, wird kein Phosphat durch OK1 auf die Stärke übertragen. Bevorzugt wird Blattstärke der *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918) verwendet.

Wird ein OK1 Protein hingegen mit P-Stärke in Gegenwart von markiertem ATP inkubiert, so kann anschließend kovalent an die P-Stärke gebundenes markiertes Phosphat nachgewiesen werden. Bevorzugt wird Stärke aus Blättern von *Arabidopsis thaliana*, besonders bevorzugt mittels eines R1 Proteins enzymatisch phosphorylierte Stärke aus *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171) verwendet.

Nachgewiesen werden können markierte Phosphatreste, die durch ein OK1 Protein in P-Stärke eingebaut wurden z.B. durch Abtrennung der markierten P-Stärke (z.B. durch Ausfällen mittels Ethanol, Filtration, chromatographische Methoden etc.) vom Rest des Reaktionsgemisches und anschließender Detektion der markierten Phosphatreste in der P-Stärke Fraktion. Die in der P-Stärke Fraktion gebundenen markierten Phosphatreste können dabei z.B. durch Bestimmung der Menge der in der P-Stärke Fraktion vorliegenden Radioaktivität (z.B. mittels Scintillationszähler) nachgewiesen werden. Mögliche Methoden zum Nachweis eines Proteins, welches P-Stärke als Substrat für eine Phosphorylierungsreaktion benötigt, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 11 und in Beispiel 6 beschrieben.

Welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in P-Stärke von einem OK1 Protein bevorzugt phosphoryliert werden, kann z.B. durch Analyse der durch ein Protein phosphorylierten P-Stärken wie bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschrieben, ermittelt werden. Hierzu wird durch ein Protein phosphorylierte P-Stärke unter Verwendung von Säure hydrolysiert und anschließend mittels Anionenaustausch-Chromatographie analysiert.

Bevorzugt wird die von einem OK1 Protein phosphorylierte P-Stärke mittels NMR analysiert, um festzustellen, welche Positionen der Kohlestoffatome (C-2, C-3 oder C-6) der Glucosemonomere in der P-Stärke phosphoryliert werden. Eine besonders bevorzugte Methode zur Identifizierung der C-Atom-Positionen eines Glucosemoleküls einer Stärke, welche durch eine von einem OK1 Protein katalysierte Reaktion phosphoryliert werden, ist weiter unten unter Allgemeine Methoden, Punkt 13 beschrieben.

Ein phosphoryliertes Protein, welches als Zwischenprodukt bei der durch ein OK1 Protein vermittelten Phosphorylierung von P-Stärke entsteht, kann wie z.B. bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) für ein R1 Protein beschrieben, nachgewiesen werden

5

Zum Nachweis des Vorliegens eines autophosphorylierten Zwischenproduktes wird ein OK1 Protein zunächst in Abwesenheit von Stärke mit markiertem ATP, bevorzugt mit spezifisch in beta-Phosphat-Position markiertem ATP, besonders bevorzugt mit spezifisch mit ^{33}P in beta-Phosphat-Position markiertem ATP inkubiert. Parallel dazu
10 wird ein Reaktionsansatz 2, der jedoch an Stelle von markiertem ATP entsprechende Mengen nicht-markiertes ATP enthält, unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert. Anschließend wird nicht markiertes ATP dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß und eine Mischung aus nicht-markiertem ATP und markiertem ATP (gleiche Menge von markiertem ATP wie zuvor in Reaktionsgemisch 1 eingesetzt
15 und gleiche Menge an nicht-markiertem ATP wie dem Reaktionsgemisch 1 im Überschuß zugesetzt) dem Reaktionsgemisch 2 hinzu gegeben und weiter inkubiert, bevor zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 1 (Teil 1A) bzw. zu einem Teil A des Reaktionsgemisches 2 (Teil 2A) P-Stärke hinzu gegeben werden. Die Reaktion im verbleibenden Teil 1B und Teil 2B des Reaktionsgemisches wird durch Denaturieren
20 des Proteins gestoppt. Das Stoppen des Teils B der Reaktionsgemische kann durch dem Fachmann bekannte Methoden, welche zur Denaturierung von Proteinen führen, bevorzugt durch Zugabe von Natriumlaurylsulfat (SDS) erfolgen. Teil 1A und Teil 2A der Reaktionsgemische werden für mindestens weitere 10 Minuten inkubiert, bevor auch diese Reaktionen gestoppt werden. Die in Teil A bzw. Teil B der
25 jeweiligen Reaktionsgemische vorliegende Stärke wird vom jeweiligen Rest der Reaktionsgemische abgetrennt. Findet die Abtrennung der jeweiligen Stärke z.B. durch Zentrifugation statt, so befindet sich die Stärke des jeweiligen Teils A bzw. jeweiligen Teils B der Reaktionsgemische nach erfolgter Zentrifugation im sedimentierten Pellet und die sich in den jeweiligen Reaktionsgemischen
30 befindlichen Proteine befinden sich im jeweiligen Zentrifugationsüberstand. Der Überstand des Teils 1A bzw. 2A und des Teils 1B bzw. 2B der Reaktionsgemische kann anschließend z.B. jeweils in einer denaturierenden Acrylamidgelelektrophorese,

gefolgt von einer Autoradiographie des erhaltenen Acrylamidgels analysiert werden. Zur Quantifizierung der Menge an radioaktiv markierten Proteinen, die mittels Acrylamidgelelektrophorese aufgetrennt wurden, kann z.B. die dem Fachmann bekannte Methode des so genannten „Phosphoimaging“ verwendet werden. Zeigt
5 die Autoradiographie oder die Analyse mittels „Phosphoimager“ von Proteinen im Zentrifugationsüberstand des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt auftritt. Die Teile A
10 und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im Zentrifugationsüberstand kein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie oder in der Analyse mittels „Phosphoimager“ aufweisen.

Zusätzlich kann die im jeweiligen sedimentierten Pellet verbliebene Stärke des jeweiligen Teils A der Reaktionsgemische 1 und 2, gegebenenfalls nach
15 anschließendem Waschen der jeweiligen Stärken, auf das Vorliegen von Stärkephosphat, welches eine dem eingesetzten markierten ATP entsprechende Markierung aufweist, hin untersucht werden. Enthalten die Stärken des Teils A des Reaktionsgemisches 1 markierte Phosphatrete und zeigt, die Autoradiographie des Zentrifugationsüberstandes des Teil B des Reaktionsgemisches 1 ein gegenüber
20 dem Zentrifugationsüberstand des Teil A des Reaktionsgemisches 1 ein signifikant erhöhtes Signal in der Autoradiographie, so zeigt dieses, dass das eine Phosphorylierung von Stärke vermittelnde Protein als autophosphoryliertes Zwischenprodukt vorliegt. Die Teile A und B des Reaktionsgemisches 2 dienen als Kontrolle und sollten daher im sedimentierten Pellet, enthaltend alpha-1,4-Glucose,
25 kein signifikant erhöhtes Signal für mit ^{33}P markierte alpha-1,4-Glucose aufweisen. Möglichkeiten zum Nachweis eines phosphorylierten OK1 Protein Zwischenproduktes sind weiter unten unter Allgemeine Methoden Punkt 12 und in Beispiel 7 beschrieben.

30 Dass ein OK1 Protein eine erhöhte Bindungsaktivität zu einer P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist, kann durch Inkubation des OK1 Proteins

mit P-Stärke und nicht-phosphorylierter-Stärke in jeweils getrennten Ansätzen erfolgen.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit nicht-phosphorylierter-Stärke sind grundsätzlich alle nicht-phosphorylierten-Stärken geeignet. Bevorzugt wird eine
5 nicht-phosphorylierte pflanzliche Stärke, besonders bevorzugt Weizenstärke und insbesondere bevorzugt granuläre Blattstärke einer *Arabidopsis thaliana* Mutante *sex1-3* verwendet.

Methoden z.B. zur Isolierung von Stärke aus Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Alle dem Fachmann bekannten Methoden sind grundsätzlich geeignet, um nicht-
10 phosphorylierte-Stärke aus entsprechenden Pflanzenspezies zu isolieren. Bevorzugt wird die weiter unten (siehe Allgemeine Methoden Punkt 2) beschriebene Methode zur Isolierung von nicht-phosphorylierten-alpha-1,4-Glucanen verwendet.

Zur Inkubation von OK1 Proteinen mit P-Stärke sind grundsätzlich alle Stärken
15 geeignet, die Stärkephosphat enthalten. Auch chemisch phosphorylierte Stärken können hierbei verwendet werden. Vorzugsweise werden zur Inkubation mit OK1 Proteinen P-Stärken eingesetzt, besonders bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche Stärke, insbesondere bevorzugt eine nachträglich enzymatisch phosphorylierte pflanzliche granuläre Stärke, die aus einer *sex-1*
20 Mutante von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurde.

Zum Nachweis einer erhöhten Bindungsaktivität von OK1 Proteinen zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke werden OK1 Proteine in voneinander getrennten Ansätzen mit P-Stärke (Ansatz A) und mit nicht-phosphorylierter-Stärke
25 (Ansatz B) inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die nicht an die betreffenden Stärken der Ansätze A und B gebundenen Proteine von den Stärken und den an sie gebundenen Proteinen abgetrennt. Die Bindung zwischen den Proteinen und der P-Stärke im Ansatz A und die Bindung zwischen den Proteinen und nicht-phosphorylierter-Stärke im Ansatz B wird anschließend aufgehoben, d.h. die
30 betreffenden Proteine werden in Lösung gebracht. Die in Lösung gebrachten Proteine des Ansatzes A und des Ansatzes B können dann von den betreffenden Stärken, die in den entsprechenden Ansätzen vorliegen, abgetrennt werden.

Daraufhin kann eine Auftrennung der isolierten P-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes A bzw. der isolierten nicht-phosphorylierte-Stärke-bindenden-Proteine des Ansatzes B, mit Hilfe von dem Fachmann bekannten Methoden, wie z.B. Gelfiltration, chromatographische Verfahren, Elektrophorese, SDS-Acrylamidgelelektrophorese etc. erfolgen. Durch Vergleich der Mengen aufgetrennter Proteine des Ansatzes A mit den Mengen korrespondierender aufgetrennter Proteine des Ansatzes B, kann ermittelt werden, ob ein Protein eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierten-Stärke aufweisen. Methoden, mit welchen eine bevorzugte Bindung von Proteinen an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke nachgewiesen werden kann, sind weiter unten (Allgemeine Methoden 8 und Beispiel 1) beschrieben.

Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die unter SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK 1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen Aminosäuresequenzen codierend ein OK1 Proteine eine Identität mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Sequenz eine Identität von mindestens 60%, insbesondere von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80% und besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% auf.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weist das OK1 Protein eine Phosphohistidindomäne auf (Tien-Shin Yu et al., 2001, Plant Cell 13, 1907-1918). Aminosäuresequenzen, codierend OK1 Proteine, enthalten eine Phosphohistidindomäne, die zu der unter SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz der Phosphohistidindomäne des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* eine Identität von mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70% und besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindestens 90% aufweist. Bevorzugt enthält die Phosphohistidindomäne zwei Histidinreste.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanzenzelle oder eine erfindungsgemäße genetisch modifizierte Pflanze, wobei die genetische Modifikation in der Einführung
5 mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.

In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „genetische Modifikation“ das Einführen von homologen und/oder heterologen fremden Nucleinsäuremolekülen in das Genom einer Pflanzenzelle oder in das Genom einer Pflanze, wobei besagtes
10 Einführen dieser Moleküle zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins führt. Durch Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen in ihrer genetischen Information verändert. Das Vorhandensein oder die Expression des fremden
15 Nucleinsäuremoleküls führt zu einer phänotypischen Veränderung. „Phänotypische“ Veränderung bedeutet dabei vorzugsweise eine messbare Veränderung einer oder mehrerer Funktionen der Zellen. Beispielsweise zeigen die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die genetisch modifizierten erfindungsgemäßen Pflanzen aufgrund des Vorhandenseins oder bei Expression des eingeführten Nucleinsäuremoleküls eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins.

20 Unter dem Begriff "fremdes Nukleinsäuremolekül" versteht man im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein solches Molekül, das entweder natürlicherweise in entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen nicht vorkommt, oder das in der konkreten räumlichen Anordnung nicht natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen vorkommt
25 oder das an einem Ort im Genom der Wildtyp-Pflanzenzelle lokalisiert ist, an dem es natürlicherweise nicht vorkommt. Bevorzugt ist das fremde Nukleinsäuremolekül ein rekombinantes Molekül, das aus verschiedenen Elementen besteht, deren Kombination oder spezifische räumliche Anordnung natürlicherweise in pflanzlichen Zellen nicht auftritt.

30 Prinzipiell kann das fremde Nucleinsäuremolekül jedes beliebige Nucleinsäuremolekül sein, das in der Pflanzenzelle oder Pflanze eine Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins bewirkt.

Unter dem Begriff „Genom“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Gesamtheit des in einer pflanzlichen Zelle vorliegenden Erbmaterials verstanden werden. Dem Fachmann ist bekannt, dass neben dem Zellkern auch andere
5 Kompartimente (z.B. Plastiden, Mitochondrien) Erbmaterial enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen dadurch gekennzeichnet, dass das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert, bevorzugt ein OK1 Protein aus
10 *Arabidopsis thaliana* oder ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

In einer weiteren Ausführungsform codiert das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein mit der in SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz. _____

15

Für die Einführung von DNA in eine pflanzliche Wirtszelle steht eine Vielzahl von Techniken zur Verfügung. Diese Techniken umfassen die Transformation pflanzlicher Zellen mit T-DNA unter Verwendung von *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes* als Transformationsmittel, die Fusion von Protoplasten,
20 die Injektion, die Elektroporation von DNA, die Einbringung der DNA mittels des biolistischen Ansatzes sowie weitere Möglichkeiten.

Die Verwendung der Agrobakterien-vermittelten Transformation von Pflanzenzellen ist intensiv untersucht und ausreichend in EP 120516; Hoekema, IN: The Binary Plant Vector System Offsetdrukkerij Kanters B.V. Alblasterdam (1985), Chapter V;
25 Fraley et al., Crit. Rev. Plant Sci. 4, 1-46 und bei An et al. EMBO J. 4, (1985), 277-287 beschrieben worden. Für die Transformation von Kartoffel, siehe z.B. Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8, (1989), 29-33).

Auch die Transformation monokotyler Pflanzen mittels auf *Agrobacterium*
30 Transformation basierender Vektoren wurde beschrieben (Chan et al., Plant Mol. Biol. 22, (1993), 491-506; Hiei et al., Plant J. 6, (1994) 271-282; Deng et al, Science in China 33, (1990), 28-34; Wilmink et al., Plant Cell Reports 11, (1992), 76-80; May

et al., Bio/Technology 13, (1995), 486-492; Conner und Domisse, Int. J. Plant Sci. 153 (1992), 550-555; Ritchie et al, Transgenic Res. 2, (1993), 252-265). Alternatives System zur Transformation von monokotylen Pflanzen ist die Transformation mittels des biolistischen Ansatzes (Wan und Lemaux, Plant Physiol. 104, (1994), 37-48; 5 Vasil et al., Bio/Technology 11 (1993), 1553-1558; Ritala et al., Plant Mol. Biol. 24, (1994), 317-325; Spencer et al., Theor. Appl. Genet. 79, (1990), 625-631), die Protoplastentransformation, die Elektroporation von partiell permeabilisierten Zellen, die Einbringung von DNA mittels Glasfasern. Insbesondere die Transformation von Mais wird in der Literatur mehrfach beschrieben (vgl. z. B. WO95/06128, 10 EP0513849, EP0465875, EP0292435; Fromm et al., Biotechnology 8, (1990), 833-844; Gordon-Kamm et al., Plant Cell 2, (1990), 603-618; Koziel et al., Biotechnology 11 (1993), 194-200; Moroc et al., Theor. Appl. Genet. 80, (1990), 721-726).

Auch die erfolgreiche Transformation anderer Getreidearten wurde bereits beschrieben, z.B. für Gerste (Wan und Lemaux, s.o.; Ritala et al., s.o.; Krens et al., 15 Nature 296, (1982), 72-74) und für Weizen (Nehra et al., Plant J. 5, (1994), 285-297; Becker et al., 1994, Plant Journal 5, 299-307). Alle vorstehenden Methoden sind im Rahmen der vorliegenden Erfindung geeignet.

Pflanzenzellen und Pflanzen, die durch Einführung eines OK1 Proteins genetisch 20 modifiziert sind, lassen sich von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen unter anderem dadurch unterscheiden, dass sie ein fremdes Nucleinsäuremolekül enthalten, das natürlicherweise in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt oder dadurch, dass ein solches Molekül an einem Ort im Genom der erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder im Genom der erfindungsgemäßen Pflanze 25 integriert vorliegt, an dem es bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt, d.h. in einer anderen genomischen Umgebung. Ferner lassen sich derartige erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen dadurch unterscheiden, dass sie mindestens eine Kopie des fremden Nucleinsäuremoleküls stabil integriert in ihr 30 Genom enthalten, gegebenenfalls zusätzlich zu natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Kopien eines solchen Moleküls. Handelt es sich bei dem (den) in die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen

- oder erfindungsgemäßen Pflanzen eingeführten fremden Nucleinsäuremolekül(en) um zusätzliche Kopien zu bereits natürlicherweise in den Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorkommenden Molekülen, so lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von
- 5 Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen insbesondere dadurch unterscheiden, dass diese zusätzliche(n) Kopie(n) an Orten im Genom lokalisiert ist (sind), an denen sie bei Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen nicht vorkommt (vorkommen). Dies lässt sich beispielsweise mit Hilfe einer Southern Blot-Analyse nachprüfen.
- Weiterhin lassen sich die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die
- 10 erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen vorzugsweise durch mindestens eines der folgenden Merkmale unterscheiden: Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül heterolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, so weisen die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen Transkripte der eingeführten Nucleinsäuremoleküle
- 15 auf. Diese lassen sich z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder durch RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) nachweisen. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, die ein Antisense- und/oder ein RNAi-Transkript exprimieren, können z.B. mit Hilfe von spezifischen Nucleinsäure-Sonden, die komplementär zur der für das Protein codierenden (natürlich in der
- 20 Pflanzenzelle vorkommenden) RNA sind, nachgewiesen werden. Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen ein Protein, das durch ein eingeführtes Nucleinsäuremolekül codiert wird. Dies kann z. B. durch immunologische Methoden, insbesondere durch eine Western-Blot-Analyse nachgewiesen werden.
- 25 Ist das eingeführte fremde Nucleinsäuremolekül homolog in Bezug auf die Pflanzenzelle oder Pflanze, können die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen von Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen beispielsweise aufgrund der zusätzlichen Expression der eingeführten fremden Nucleinsäuremoleküle unterschieden werden. Die erfindungsgemäßen
- 30 Pflanzenzellen und die erfindungsgemäßen Pflanzen enthalten vorzugsweise Transkripte der fremden Nucleinsäuremoleküle. Dies kann z. B. durch Northern-Blot-Analyse oder mit Hilfe der so genannten quantitativen PCR nachgewiesen werden.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und bei den erfindungsgemäßen Pflanzen um transgene Pflanzenzellen bzw. transgene Pflanzen.

5

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 10 a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- 15 c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der codierenden Region der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der
20 codierenden Region der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- 25 g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 60% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), d), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- 30 i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und

- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

- 5 Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codiert ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*.

Die von den verschiedenen Varianten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle
10 codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können
z.B. biologische Aktivität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität,
Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das
Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten,
Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität;
15 pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc..

Das von der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz abgeleitete
Molekulargewicht des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana* beträgt ca. 131 kDa
und das von der unter SEQ ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenz abgeleitete
Molekulargewicht des OK1 Proteins aus *Oryza sativa* beträgt ca. 132 kDa. Das von
20 der codierenden Aminosäuresequenz abgeleitete Molekulargewicht eines
erfindungsgemäßen Proteins liegt daher vorzugsweise im Bereich von 120 kDa bis
145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis
140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa.

Die in SEQ ID NO 2 und SEQ ID NO 4 dargestellten Aminosäuresequenzen
25 codierend OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Oryza sativa* enthalten jeweils
eine Phosphohistidindomäne. Bevorzugt enthält daher ein erfindungsgemäßes OK 1
Protein eine Phosphohistidindomäne, welche zu der unter SEQ ID NO 5
dargestellten Phosphohistidindomäne eine Identität von mindestens 50%, bevorzugt
von mindestens 60%, besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere
30 bevorzugt von mindesten 90% aufweist.

Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der erfindungsgemäßen enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, wobei das codierte OK1 Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von
5 mindestens 95% zu den unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenzen aufweist.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM, enthaltend eine cDNA, die ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* codiert und das Plasmid pMI50, enthaltend eine cDNA, die ein
10 OK1 Protein aus *Oryza sativa* codiert, wurden nach dem Budapester Vertrag hinterlegt bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Deutschland. Die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid A.t.-OK1-pGEM integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein
15 OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Die in SEQ ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz kann von der codierenden Region der in Plasmid pMI50 integrierten cDNA Sequenz abgeleitet werden und codiert für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins codieren, das die
20 Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder die von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird, wobei das codierte Protein eine Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der Aminosäuresequenz, die von der Insertion in A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 abgeleitet
25 werden kann, aufweist.

Die in SEQ ID NO 1 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die codierende Region für ein OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* und die in SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz ist eine cDNA Sequenz, die die
30 codierende Region für ein OK1 Protein aus *Oryza sativa* umfasst.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein codieren und die codierende Region der unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID

NO 3 dargestellten Nucleotidsequenzen oder zu diesen komplementäre Sequenzen umfassen, Nucleinsäuremoleküle, die die codierende Region der Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen und Nucleinsäuremoleküle, die zu den genannten Nucleinsäuremolekülen eine
5 Identität von mindestens 70%, bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von mindestens 95% aufweisen.

Mit Hilfe der Sequenzinformation erfindungsgemäßer Nucleinsäuremoleküle bzw. mit Hilfe eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls ist es dem Fachmann nun möglich, homologe Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies, vorzugsweise aus
10 Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere *Oryza sativa* oder aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Dies kann beispielsweise mit Hilfe konventioneller Methoden, wie dem Durchmustern von cDNA oder genomischen Banken mit geeigneten Hybridisierungsproben erfolgen. Dem Fachmann ist bekannt, dass die Isolierung homologer Sequenzen auch mit Hilfe von

15 (degenerierten) Oligonucleotiden und der Verwendung von PCR basierten Methoden erfolgen kann.

Auch die Durchmusterung von Datenbanken wie sie z.B. von EMBL (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/index.htm>) oder NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) zur Verfügung gestellt werden, kann zur
20 Identifizierung von homologen Sequenzen, die für OK1 Protein codieren, dienen. Hierbei wird eine oder werden mehrere Sequenzen als so genannte Abfrage (= query) vorgegeben. Diese Abfragesequenz wird dann mittels statistischen Computerprogrammen mit Sequenzen, die in den ausgewählten Datenbanken enthalten sind, verglichen. Solche Datenbankabfragen (z.B. blast- oder fasta
25 searches) sind dem Fachmann bekannt und können bei verschiedenen Anbietern durchgeführt werden.

Wird eine solche Datenbankabfrage z.B. beim NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchgeführt, so sollen die Standardeinstellungen, die für die jeweilige Vergleichsanfrage vorgegeben sind,
30 benutzt werden. Für Proteinsequenzvergleiche (blastp) sind dieses folgende Einstellungen: Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low compexity aktiviert; Expect

value = 10; word size = 3; Matrix = BLOSUM62; Gap costs: Existence = 11, Extension = 1.

Für Nucleinsäuresequenzvergleich (blastn) sind folgende Parameter einzustellen:
Limit entrez = nicht aktiviert; Filter = low complexity aktiviert; Expect value = 10; word
5 size = 11.

Bei einer solchen Datenbankrecherche können z.B. die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Sequenzen als Abfragesequenz (query) verwendet werden, um weitere Nucleinsäuremoleküle und/oder Proteine zu identifizieren, die ein OK1 Protein codieren.

- 10 Mit Hilfe der beschriebenen Methoden ist es auch möglich, erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle zu identifizieren und/oder zu isolieren, die mit der unter SEQ ID NO 1 oder unter SEQ ID NO 3 angegebenen Sequenz hybridisieren und die ein OK1 Protein codieren.

Der Begriff "Hybridisierung" bedeutet im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine

- 15 Hybridisierung unter konventionellen Hybridisierungsbedingungen, vorzugsweise unter stringenten Bedingungen, wie sie beispielsweise in Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002); ISBN: 0471250929)
20 beschrieben sind. Besonders bevorzugt bedeutet "Hybridisierung" eine Hybridisierung unter den folgenden Bedingungen:

Hybridisierungspuffer:

- 2xSSC; 10xDenhardt-Lösung (Fikoll 400+PEG+BSA; Verhältnis 1:1:1); 0,1%
SDS; 5 mM EDTA; 50 mM Na₂HPO₄; 250 µg/ml Heringssperma DNA; 50 µg/ml
25 tRNA; oder

25 M Natriumphosphatpuffer pH 7,2; 1 mM EDTA; 7% SDS

Hybridisierungstemperatur:

T=65 bis 68°C

Waschpuffer: 0,1xSSC; 0,1% SDS

- 30 Washtemperatur: T=65 bis 68°C.

Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können prinzipiell aus jeder beliebigen Pflanzenspezies stammen, die ein entsprechendes Protein codiert, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Spezies der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt aus *Oryza sativa*. Nucleinsäuremoleküle, die mit den erfindungsgemäßen Molekülen hybridisieren, können z.B. aus genomischen oder aus cDNA-Bibliotheken isoliert werden. Die Identifizierung und Isolierung derartiger Nucleinsäuremoleküle kann dabei unter Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Teile dieser Moleküle bzw. der reversen Komplemente dieser Moleküle erfolgen, z.B. mittels Hybridisierung nach Standardverfahren (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN: 0471250929) oder durch Amplifikation mittels PCR.

Als Hybridisierungsprobe können z.B. Nucleinsäuremoleküle verwendet werden, die exakt die oder im Wesentlichen die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 angegebene Nucleotidsequenz oder Teile dieser Sequenzen aufweisen. Bei den als Hybridisierungsprobe verwendeten Fragmenten kann es sich auch um synthetische Fragmente oder Oligonucleotide handeln, die mit Hilfe der gängigen Synthesetechniken hergestellt wurden und deren Sequenz im wesentlichen mit der eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls übereinstimmt. Hat man Gene identifiziert und isoliert, die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuresequenzen hybridisieren, sollte eine Bestimmung der Sequenz und eine Analyse der Eigenschaften der von dieser Sequenz codierten Proteine erfolgen, um festzustellen, ob es sich um ein OK1 Protein handelt. Hierzu eignen sich insbesondere Homologievergleiche auf der Ebene der Nucleinsäure- oder Aminosäuresequenz sowie die Bestimmung der enzymatischen Aktivität. Die Aktivität eines OK1 Proteins kann z.B. wie oben oder unter Allgemeinen Methoden Punkt 11 beschrieben, erfolgen. Eine bevorzugte Bindungsaffinität zu P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke, und Autophosphorylierung eines OK1 Proteins können nach

den oben bereits und unter Allgemeine Methoden Punkte 8 und 12 beschriebenen Methoden nachgewiesen werden.

Die mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisierenden Moleküle umfassen insbesondere Fragmente, Derivate und allelische Varianten der
5 erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, die ein OK1 Protein aus Pflanzen, vorzugsweise aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Pflanzenspezies der Gattung *Oryza*, insbesondere bevorzugt aus *Oryza sativa* oder *Arabidopsis thaliana* codieren. Der Begriff „Derivat“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Sequenzen dieser Moleküle sich von den Sequenzen der oben
10 beschriebenen Nucleinsäuremoleküle an einer oder mehreren Positionen unterscheiden und einen hohen Grad an Identität zu diesen Sequenzen aufweisen. Die Abweichungen zu den oben beschriebenen Nucleinsäuremolekülen können dabei z.B. durch Deletion, Addition, Substitution, Insertion oder Rekombination entstanden sein.

15

Der Begriff „Identität“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine Sequenzidentität über die gesamte Länge der codierenden Region von mindestens 60%, insbesondere eine Identität von mindestens 80%, vorzugsweise über 80%, besonders bevorzugt über 90% und insbesondere von mindestens 95%.

20 Unter dem Begriff „Identität“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung die Anzahl der übereinstimmenden Aminosäuren/Nucleotide (Identität) mit anderen Proteinen/Nucleinsäuren, ausgedrückt in Prozent verstanden werden. Bevorzugt wird die Identität durch Vergleiche der SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 für Aminosäuren oder SEQ. ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 für Nucleinsäuren zu anderen
25 Proteinen/Nucleinsäuren mit Hilfe von Computerprogrammen ermittelt. Weisen Sequenzen, die miteinander verglichen werden, unterschiedliche Längen auf, ist die Identität so zu ermitteln, dass die Anzahl an Aminosäuren, welche die kürzere Sequenz mit der längeren Sequenz gemeinsam hat, den prozentualen Anteil der Identität bestimmt. Vorzugsweise wird die Identität mittels des bekannten und der
30 Öffentlichkeit zur Verfügung stehenden Computerprogramms ClustalW (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22 (1994), 4673-4680) ermittelt. ClustalW wird öffentlich zur Verfügung gestellt von Julie Thompson (Thompson@EMBL-Heidelberg.DE) und

Toby Gibson (Gibson@EMBL-Heidelberg.DE), European Molecular Biology Laboratory, Meyerhofstrasse 1, D 69117 Heidelberg, Germany. ClustalW kann ebenfalls von verschiedenen Internetseiten, u.a. beim IGBMC (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, B.P.163, 67404 Illkirch Cedex, France; 5 ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/) und beim EBI (ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/) sowie bei allen gespiegelten Internetseiten des EBI (European Bioinformatics Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge CB10 1SD, UK), heruntergeladen werden.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um 10 die Identität zwischen erfindungsgemäßen Proteinen und anderen Proteinen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=1, TOPDIAG=5, WINDOW=5, PAIRGAP=3, GAOPEN=10, GAPEXTEND=0.05, GAPDIST=8, MAXDIV=40, MATRIX=GONNET, ENDGAPS(OFF), NOPGAP, NOHGAP.

Vorzugsweise wird das ClustalW Computerprogramm der Version 1.8 benutzt, um 15 die Identität zwischen z.B. der Nucleotidsequenz der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle und der Nucleotidsequenz von anderen Nucleinsäuremolekülen zu bestimmen. Dabei sind folgende Parameter einzustellen: KTUPLE=2, TOPDIAGS=4, PAIRGAP=5, DNAMATRIX:IUB, GAOPEN=10, GAPEXT=5, MAXDIV=40, TRANSITIONS: unweighted.

20

Identität bedeutet ferner, dass funktionelle und/oder strukturelle Äquivalenz zwischen den betreffenden Nucleinsäuremolekülen oder den durch sie codierten Proteinen, besteht. Bei den Nucleinsäuremolekülen, die homolog zu den oben beschriebenen Molekülen sind und Derivate dieser Moleküle darstellen, handelt es sich in der Regel 25 um Variationen dieser Moleküle, die Modifikationen darstellen, die dieselbe biologische Funktion ausüben. Es kann sich dabei sowohl um natürlicherweise auftretende Variationen handeln, beispielsweise um Sequenzen aus anderen Pflanzenspezies oder um Mutationen, wobei diese Mutationen auf natürliche Weise aufgetreten sein können oder durch gezielte Mutagenese eingeführt wurden. Ferner 30 kann es sich bei den Variationen um synthetisch hergestellte Sequenzen handeln. Bei den allelischen Varianten kann es sich sowohl um natürlich auftretende Varianten handeln, als auch um synthetisch hergestellte oder durch rekombinante DNA-

Techniken erzeugte Varianten. Eine spezielle Form von Derivaten stellen z.B. Nucleinsäuremoleküle dar, die auf Grund der Degeneration des genetischen Codes von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen abweichen.

- 5 Die von den verschiedenen Derivaten der erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle codierten Proteine weisen bestimmte gemeinsame Charakteristika auf. Dazu können z.B. biologische Aktivität, Substratspezifität, Molekulargewicht, immunologische Reaktivität, Konformation etc. gehören, sowie physikalische Eigenschaften wie z.B. das Laufverhalten in Gelelektrophoresen, chromatographisches Verhalten,
- 10 Sedimentationskoeffizienten, Löslichkeit, spektroskopische Eigenschaften, Stabilität; pH-Optimum, Temperatur-Optimum etc.. Bevorzugte Eigenschaften eines OK1 Proteins wurden oben bereits im Detail erörtert und sind hier entsprechend anzuwenden.
-
- 15 Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können beliebige Nucleinsäuremoleküle sein, insbesondere DNA- oder RNA-Moleküle, beispielsweise cDNA, genomische DNA, mRNA etc. Sie können natürlich vorkommende Moleküle sein, oder durch gentechnische oder chemische Syntheseverfahren hergestellte Moleküle. Sie können einzelsträngige Moleküle sein, die entweder den codierenden
- 20 oder den nicht codierenden Strang enthalten, oder doppelsträngige Moleküle.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ausgewählt ist, aus der Gruppe bestehend aus

- 25 a) T-DNA Molekülen, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
- b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration in das pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (Transposon activation tagging);
- 30 c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein codieren und mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein Aktivität in der Zelle führen.

d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nucleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK1 Protein codierenden Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Protein codierenden Gens bewirkt.

5

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen auch durch die Verwendung der so genannten Insertionsmutagenese (Übersichtsartikel: Thorneycroft et al., 2001, Journal of experimental Botany 52 (361), 1593-1601) hergestellt werden. Unter
10 Insertionsmutagenese ist im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung insbesondere das Inserieren von Transposons oder so genannter Transfer DNA (T-DNA) in ein Gen oder in die Nähe eines Gens, codierend ein OK1 Protein zu verstehen, wobei dadurch die Aktivität eines OK1 Proteins in der betreffenden Zelle erhöht wird.

15 Bei den Transposons kann es sich dabei sowohl um solche handeln, die in der Zelle natürlicherweise vorkommen (endogene Transposons), als auch um solche, die natürlicherweise nicht in besagter Zelle vorkommen, sondern mittels gentechnischer Methoden, wie z.B. Transformation der Zelle, in die Zelle eingeführt wurden (heterologe Transposons). Die Veränderung der Expression von Genen mittels
20 Transposons ist dem Fachmann bekannt. Eine Übersicht über die Nutzung von endogenen und heterologen Transposons als Werkzeuge in der Pflanzenbiotechnologie ist in Ramachandran und Sundaresan (2001, Plant Physiology and Biochemistry 39, 234-252) dargestellt.

Die T-DNA Insertionsmutagenese beruht darauf, dass bestimmte Abschnitte (T-DNA)
25 von Ti-Plasmiden aus *Agrobacterium* in das Genom von pflanzlichen Zellen integrieren können. Der Ort der Integration in das pflanzliche Chromosom ist dabei nicht festgelegt, sondern kann an jeder beliebigen Stelle erfolgen. Integriert die T-DNA in einen Abschnitt oder in die Nähe eines Abschnittes des Chromosoms, der eine Genfunktion darstellt, so kann dieses zur Erhöhung der Genexpression und
30 damit auch zur Änderung der Aktivität eines durch das betreffende Gen codierten Proteins führen.

Die in das Genom inserierten Sequenzen (insbesondere Transposons oder T-DNA) zeichnen sich dabei dadurch aus, dass sie Sequenzen enthalten, die zu einer Aktivierung von regulatorischen Sequenzen eines OK1 Gens führen ("activation tagging").

5

Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und Pflanzen können mit Hilfe der Methode des so genannten "activation taggings" (siehe z. B. Walden et al., Plant J. (1991), 281-288; Walden et al., Plant Mol. Biol. 26 (1994), 1521-1528) erzeugt werden. Diese Methode beruht auf der Aktivierung endogener Promotoren durch "enhancer"-
10 Sequenzen, wie z.B. dem Enhancer des 35S RNA-Promoters des Blumenkohlmosaikvirus oder dem Octopinsynthase-Enhancers.

Unter dem Begriff „T-DNA activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein T-DNA Fragment verstanden werden, das "enhancer"-
15 Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt.

Unter dem Begriff „Transposon activation tagging“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Transposon verstanden werden, das "enhancer"-
20 Sequenzen enthält und durch Integration in das Genom einer Pflanzenzelle zu der Erhöhung der Aktivität mindestens eines OK1 Proteins führt.

In einer weiteren Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen DNA Moleküle, die ein OK1 Protein codieren, mit regulatorischen Sequenzen verknüpft, die die
25 Transkription in pflanzlichen Zellen initiieren (Promotoren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein Aktivität in der Zelle führen. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle liegen dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung vor.

30 Zur Expression von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, die ein OK1 Protein codieren, werden diese vorzugsweise mit regulatorischen DNA-Sequenzen verknüpft, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten. Hierzu zählen

insbesondere Promotoren. Generell kommt für die Expression jeder in pflanzlichen Zellen aktive Promotor in Frage.

Der Promotor kann dabei so gewählt sein, dass die Expression konstitutiv erfolgt oder nur in einem bestimmten Gewebe, zu einem bestimmten Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung oder zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt. Sowohl in Bezug auf die Pflanze als auch in Bezug auf das Nucleinsäuremolekül kann der Promotor homolog oder heterolog sein.

Geeignete Promotoren sind z.B. der Promotor der 35S RNA des Cauliflower Mosaic Virus und der Ubiquitin-Promotor aus Mais für eine konstitutive Expression, der Patatingen-Promotor B33 (Rocha-Sosa et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) für eine knollenspezifische Expression in Kartoffeln oder ein Promotor, der eine Expression lediglich in photosynthetisch aktiven Geweben sicherstellt, z.B. der ST-LS1-Promotor (Stockhaus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987), 7943-7947; Stockhaus et al., EMBO J. 8 (1989), 2445-2451) oder für eine endosperm-spezifische Expression der HMG-Promotor aus Weizen, der USP-Promotor, der Phaseolinpromotor, Promotoren von Zein-Genen aus Mais (Pedersen et al., Cell 29 (1982), 1015-1026; Quatroccio et al., Plant Mol. Biol. 15 (1990), 81-93), Glutelin-Promotor (Leisy et al., Plant Mol. Biol. 14 (1990), 41-50; Zheng et al., Plant J. 4 (1993), 357-366; Yoshihara et al., FEBS Lett. 383 (1996), 213-218) oder Shrunk-1 Promotor (Werr et al., EMBO J. 4 (1985), 1373-1380). Es können jedoch auch Promotoren verwendet werden, die nur zu einem durch äußere Einflüsse determinierten Zeitpunkt aktiviert werden (siehe beispielsweise WO 9307279). Von besonderem Interesse können hierbei Promotoren von heat-shock Proteinen sein, die eine einfache Induktion erlauben. Ferner können samenspezifische Promotoren verwendet werden, wie z.B. der USP-Promoter aus Vicia faba, der eine samenspezifische Expression in Vicia faba und anderen Pflanzen gewährleistet (Fiedler et al., Plant Mol. Biol. 22 (1993), 669-679; Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet. 225 (1991), 459-467).

Ferner kann eine Terminationssequenz (Polyadenylierungssignal) vorhanden sein, die der Addition eines Poly-A-Schwanzes an das Transkript dient. Dem Poly-A-Schwanz wird eine Funktion bei der Stabilisierung der Transkripte beigemessen.

Derartige Elemente sind in der Literatur beschrieben (vgl. Gielen et al., EMBO J. 8 (1989), 23-29) und sind beliebig austauschbar.

Es können auch Intronsequenzen zwischen dem Promotor und der codierenden
5 Region vorhanden sein. Solche Intronsequenzen können zur Stabilität der
Expression und zu einer erhöhten Expression in Pflanzen führen (Callis et al., 1987,
Genes Devel. 1, 1183-1200; Luehrsen, and Walbot, 1991, Mol. Gen. Genet. 225, 81-
93; Rethmeier, et al., 1997; Plant Journal. 12(4):895-899; Rose and Beliakoff, 2000,
Plant Physiol. 122 (2), 535-542; Vasil et al., 1989, Plant Physiol. 91, 1575-1579; XU
10 et al., 2003, Science in China Series C Vol.46 No.6, 561-569). Geeignete
Intronsequenzen sind beispielsweise das erste Intron des sh1-Gens aus Mais, das
erste Intron des Poly-Ubiquitin Gens 1 aus Mais, das erste Intron des EPSPS Gens
aus Reis oder eines der beiden ersten Introns des PAT1 Gens aus Arabidopsis.

15 Weiterhin können erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße
Pflanzen mittels der so genannten "*in situ*-Aktivierung", hergestellt werden. Die
eingeführte genetische Modifikation bewirkt dabei eine Veränderung der
regulatorischen Sequenzen endogener OK1 Gene, was zu einer verstärkten
Expression von OK1 Genen führt. Bevorzugt geschieht die Aktivierung eines OK1
20 Gens durch „*in vivo*“ Mutagenese eines Promotors oder von „enhancer“-Sequenzen
eines endogenen OK1 Gens. Dabei kann z.B. ein Promotor oder eine „enhancer“-
Sequenz durch Mutagenese derart verändert werden, dass die erzeugte Mutation in
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einer
erhöhten Expression eines OK1 Gens führt im Vergleich zur Expression eines OK1
25 Gens in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen. Die Mutation in einem
Promotor oder einer „enhancer“-Sequenz kann auch dazu führen, dass OK1 Gene in
erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen zu einem
Zeitpunkt exprimiert werden, zu welchem sie in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-
Pflanzen nicht exprimiert werden.

30

Unter dem Begriff „OK1 Gen“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung
ein Nucleinsäuremolekül (cDNA, DNA) verstanden werden, das ein OK1 Protein,

vorzugsweise ein OK1 Protein aus Stärke speichernden Pflanzen besonders bevorzugt, aus *Arabidopsis thaliana*, insbesondere bevorzugt aus Reis, codiert.

Bei der so genannten "*in vivo*-Mutagenese" wird durch Transformation von
5 Pflanzenzellen ein hybrides RNA-DNA-Oligonucleotid ("Chimeroplast") in
Pflanzenzellen eingeführt (Kipp, P.B. et al., Poster Session beim " 5th International
Congress of Plant Molecular Biology, 21.-27. September 1997, Singapore; R. A.
Dixon und C.J. Arntzen, Meeting report zu "Metabolic Engineering in Transgenic
Plants", Keystone Symposia, Copper Mountain, CO, USA, TIBTECH 15, (1997), 441-
10 447; internationale Patentanmeldung WO 9515972; Kren et al., Hepatology 25,
(1997), 1462-1468; Cole-Strauss et al., Science 273, (1996), 1386-1389; Beetham et
al., 1999, PNAS 96, 8774-8778).

Ein Teil der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids ist homolog zu einer
Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens, weist jedoch im Vergleich zur
15 Nucleinsäuresequenz eines endogenen OK1 Gens eine Mutation auf oder enthält
eine heterologe Region, die von den homologen Regionen umschlossen ist.
Durch Basenpaarung der homologen Regionen des RNA-DNA-Oligonucleotids und
des endogenen Nukleinsäuremoleküls, gefolgt von homologer Rekombination, kann
die in der DNA-Komponente des RNA-DNA-Oligonucleotids enthaltene Mutation oder
20 heterologe Region in das Genom einer Pflanzenzelle übertragen werden. Dies führt
zu einer Erhöhung der Aktivität eines oder mehrerer OK1 Proteine.

Alle diese Methoden beruhen auf der Einführung eines fremden
Nucleinsäuremoleküls in das Genom einer Pflanzenzelle oder Pflanze und sind
25 daher grundsätzlich zu Herstellung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen und
erfindungsgemäßer Pflanzen geeignet.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass erfindungsgemäße Pflanzenzellen
und erfindungsgemäße Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren im Vergleich
30 zu Stärke von entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen
bzw. Wildtyp-Pflanzen.

Die erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke, die in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften, insbesondere dem Gehalt an Stärkephosphat bzw. der Phosphatverteilung im Vergleich zu in Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen synthetisierter Stärke verändert ist, so dass diese für spezielle Verwendungszwecke
5 besser geeignet ist.

Da bisher keine Enzyme beschrieben sind, die ausschließlich P-Stärke phosphorylieren, war es bisher auch nicht möglich, den Gehalt an Stärkephosphat von
10 bereits phosphorylierter-Stärke in Pflanzen über ein gewisses Maß hinaus zu steigern. Diese ist nun durch Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins oder einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure zur genetischen Modifikation von Pflanzen möglich.

Auch die Phosphatverteilung in von Pflanzen synthetisierter Stärke war aus Mangel
15 an zur Verfügung stehenden Mitteln bisher nicht möglich. Durch die Bereitstellung erfindungsgemäßer Proteine und Nucleinsäuren durch die vorliegende Erfindung ist nun auch eine Veränderung des Phosphatverhältnisses in nativen Stärken möglich.

Daher umfasst die vorliegende Erfindung auch erfindungsgemäße Pflanzenzellen
20 und erfindungsgemäße Pflanzen, die eine modifizierte Stärke synthetisieren, im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyppflanzen.

Der Begriff „modifizierte Stärke“ bedeutet in Zusammenhang mit der vorliegenden
25 Erfindung, dass die Stärke veränderte physiko-chemische Eigenschaften gegenüber nicht modifizierter Stärke, erhältlich aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren
30 erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte

Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen aufweist.

Unter dem Begriff „Phosphatverteilung“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden
5 Erfindung der Anteil des in C-2-Position, C-3-Position oder C-6-Position eines
Glucosemoleküles gebundenen Stärkephosphates bezogen auf den Gesamtgehalt
an Stärkephosphat von Stärke verstanden werden.

10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung synthetisieren
erfindungsgemäße Pflanzenzellen oder erfindungsgemäße Pflanzen eine Stärke, die
ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich
zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Bevorzugt sind dabei
Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem
15 Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat
aufweisen im Vergleich zu Stärken aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-
Pflanzenzellen bzw. nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Unter dem Begriff „Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat“ soll im
Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung der Anteil an Stärkephosphat
20 verstanden werden, zu welchem das jeweils in C-3-Position bzw. C-6-Position
gebundene Stärkephosphat eines alpha-1,4-Glucans zu der Summe aus dem in C-3-
Position und in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat (C-3-Position + C-6-
Position) des betreffenden alpha-1,4-Glucans beiträgt.

25 Zur Bestimmung der Menge an Stärkephosphat sind verschiedene Methoden
beschrieben. Bevorzugt kann die bei Ritte et al. (2000, Starch/Stärke 52, 179-185)
beschriebene Methode zur Bestimmung der Menge von Stärkephosphat verwendet
werden. Besonders bevorzugt wird die Bestimmung der Menge an Stärkephosphat
mittels ³¹P-NMR nach der bei Kasemüsuwan und Jane (1996, Cereal Chemistry 73,
30 702-707) beschriebenen Methode durchgeführt.

Ferner sind Gegenstand der Erfindung genetisch modifizierte Pflanzen, die erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten. Derartige Pflanzen können durch Regeneration aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen erzeugt werden.

- 5 Bei den erfindungsgemäßen Pflanzen kann es sich prinzipiell um Pflanzen jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl um monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Nutzpflanzen, d.h. Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke.

10

In einer weiteren Ausführungsform ist die erfindungsgemäße Pflanze, eine Stärke speichernde Pflanze.

- 15 Der Begriff "Stärke speichernde Pflanzen" meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Pflanzen mit Pflanzenteilen, die eine Speicherstärke enthalten, wie z.B. Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse, oder Sorghum.

- 20 Der Begriff „Kartoffelpflanze“ oder „Kartoffel“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Solanum*, besonders Knollen produzierende Spezies der Gattung *Solanum* und insbesondere *Solanum tuberosum*.

- 25 Der Begriff „Weizenpflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* oder Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, besonders in der Agrarwirtschaft zu kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Triticum* bzw. Pflanzen, die aus Kreuzungen mit Pflanzen der Gattung *Triticum* hervorgegangen sind, insbesondere bevorzugt *Triticum aestivum*.

- 30 Der Begriff „Maispflanze“ meint im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders in der Agrarwirtschaft zu

kommerziellen Zwecken angebaute Pflanzenspezies der Gattung *Zea*, besonders bevorzugt *Zea mays*.

5 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäße stärke-speichernde Pflanzen der (systematischen) Familie Poaceae. Bevorzugt handelt es sich dabei um Mais- oder Weizenpflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch Vermehrungsmaterial erfindungsgemäßer Pflanzen, enthaltend eine erfindungsgemäße Pflanzenzelle.

10

Der Begriff „Vermehrungsmaterial“ umfasst dabei jene Bestandteile der Pflanze, die geeignet sind zur Erzeugung von Nachkommen auf vegetativem oder sexuellem Weg. Für die vegetative Vermehrung eignen sich beispielsweise Stecklinge, Calluskulturen, Rhizome oder Knollen. Anderes Vermehrungsmaterial umfasst

15 beispielsweise Früchte, Samen, Sämlinge, Protoplasten, Zellkulturen, etc. Vorzugsweise handelt es sich bei dem Vermehrungsmaterial um Knollen und besonders bevorzugt um endospermhaltige Körner.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erntebare Pflanzenteile erfindungsgemäßer Pflanzen, wie Früchte, Speicherwurzeln, Wurzeln, Blüten, Knospen, Sprosse oder Stämme, vorzugsweise Samen, Körner oder Knollen, wobei diese erntebaren Teile erfindungsgemäße Pflanzenzellen enthalten.

25 Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze, worin

- a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
- b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird;
- 30 c) und gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.

Für die laut Schritt a) in die Pflanzenzelle eingeführte genetische Modifikation gilt, dass es sich grundsätzlich um jede Art von Modifikation handeln kann, die zur Erhöhung der Aktivität eines OK1 Proteins führt

Die Regeneration der Pflanzen gemäß Schritt (b) kann nach dem Fachmann
5 bekannten Methoden erfolgen (z.B. beschrieben in „Plant Cell Culture Protocols“, 1999, ed. by R.D. Hall, Humana Press, ISBN 0-89603-549-2).

Die Erzeugung weiterer Pflanzen gemäß Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens kann z.B. erfolgen durch vegetative Vermehrung (beispielsweise über
10 Stecklinge, Knollen oder über Calluskultur und Regeneration ganzer Pflanzen) oder durch sexuelle Vermehrung. Die sexuelle Vermehrung findet dabei vorzugsweise kontrolliert statt, d.h. es werden ausgewählte Pflanzen mit bestimmten Eigenschaften miteinander gekreuzt und vermehrt. Die Auswahl erfolgt dabei bevorzugt in der Weise, dass die weiteren Pflanzen, die nach Schritt c) erhalten werden, die
15 genetische Modifikation, die in Schritt a) eingeführt wurde, aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines erfindungsgemäßen fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanzenzelle, wobei das Vorhandensein
20 oder die Expression besagten fremden Nucleinsäuremoleküls zu einer erhöhten Aktivität eines OK1 Proteins in der Zelle führt.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht die genetische Modifikation in der Einführung eines fremden Nucleinsäuremoleküls in
25 das Genom der Pflanzenzelle, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanze zur Erzeugung
30 von Stärke speichernden Pflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren zur Erzeugung erfindungsgemäßer Mais- oder Weizenpflanzen verwendet.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens, ist das
5 fremde Nukleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGE oder der Insertion in
10 Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine
15 Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid pMI50 codiert wird;
- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- 20 f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- h) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b),
25 e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- i) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- 30 j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle darstellen.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist das fremde Nukleinsäuremolekül ausgewählt, aus der Gruppe bestehend aus

- 5 a) T-DNA Molekülen, die durch Integration ins pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (T-DNA activation tagging);
- b) DNA Molekülen, die Transposons enthalten, die durch Integration ins pflanzliche Genom zu einer Erhöhung der Expression eines OK1 Gens führen (Transposon activation tagging);
- 10 c) DNA Molekülen, die ein OK1 Protein codieren und mit regulatorischen Sequenzen verknüpft sind, die die Transkription in pflanzlichen Zellen gewährleisten (initiiieren) und zu einer Erhöhung einer OK1 Protein Aktivität in der Zelle führen;
- 15 d) Mittels *in vivo*-Mutagenese eingeführte Nukleinsäuremoleküle, die zu einer Mutation oder einer Insertion einer heterologen Sequenz in mindestens einem endogenen OK 1 Gen führen, wobei die Mutation oder Insertion eine Erhöhung der Expression eines OK1 Gens bewirkt.

20 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Verfahren, worin die genetisch modifizierte Pflanze eine modifizierte Stärke synthetisiert im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

25 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die einen erhöhten Gehalt an Stärkrophosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung im Vergleich zu Stärke, isoliert aus entsprechenden Wildtyp-Pflanzen aufweist.

30 In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens synthetisieren die erfindungsgemäßen Pflanzen eine modifizierte Stärke, die ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Insbesondere bevorzugt sind dabei Stärken, welche einen erhöhten Anteil von in C-3-Position gebundenem

Stärkephosphat gegenüber von in C-6-Position gebundenem Stärkephosphat aufweisen im Vergleich zu Stärke aus nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch die durch erfindungsgemäße Verfahren
5 erhältlichen Pflanzen.

Es wurde überraschenderweise gefunden, dass Stärke, isoliert aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen, eine modifizierte Stärke
10 synthetisieren.

Insbesondere die erhöhten Mengen an Stärkephosphat erfindungsgemäßer Stärken verleihen den Stärken überraschende und vorteilhafte Eigenschaften. Erfindungsgemäße Stärken tragen durch den erhöhten Anteil an Stärkephosphat einen erhöhten Anteil an geladenen Gruppen, die die funktionellen Eigenschaften der
15 Stärke wesentlich beeinflussen. Stärke, die geladene funktionelle Gruppen trägt, ist insbesondere in der Papierindustrie einsetzbar, wo sie für die Oberflächenbeschichtung (Coating) von Papier verwendet werden. Papier, welches mit geladenen Molekülen, die außerdem gute Klebeeigenschaften aufweisen, beschichtet ist, eignet sich besonders für die Aufnahme von Farbstoffen, wie z.B.
20 Tinte, Druckfarben etc..

Die vorliegende Erfindung betrifft auch modifizierte Stärken, erhältlich aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren
25 Pflanzenteilen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung erfindungsgemäß modifizierte Stärke aus stärkepeichernden Pflanzen, bevorzugt aus Stärke speichernden Pflanzen der (systematischen) Familie Poaceae, besonders
30 bevorzugt aus Mais- oder Weizenpflanzen..

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke, umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer erfindungsgemäßen Pflanzenzelle oder einer erfindungsgemäßen Pflanze, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial einer solchen Pflanze und/oder aus
5 erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen einer solchen Pflanze, vorzugsweise aus erfindungsgemäßen stärke-speichernden Teilen einer solchen Pflanze. Vorzugsweise umfasst ein solches Verfahren auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials dieser Pflanzen vor der Extraktion der Stärke und besonders bevorzugt ferner den Schritt
10 der Kultivierung erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Verfahren zur Extraktion der Stärke aus Pflanzen oder von Stärke speichernden Teilen von Pflanzen sind dem Fachmann bekannt. Weiterhin sind Verfahren zur Extraktion der Stärke aus verschiedenen Stärke speichernde Pflanzen beschrieben,
15 z. B. in Starch: Chemistry and Technology (Hrsg.: Whistler, BeMiller und Paschall (1994), 2. Ausgabe, Academic Press Inc. London Ltd; ISBN 0-12-746270-8; siehe z. B. Kapitel XII, Seite 412-468: Mais und Sorghum Stärken: Herstellung; von Watson; Kapitel XIII, Seite 469-479: Tapioca, Arrowroot und Sago Stärken: Herstellung; von Corbishley und Miller; Kapitel XIV, Seite 479-490: Kartoffelstärke: Herstellung und
20 Verwendungen; von Mitch; Kapitel XV, Seite 491 bis 506: Weizenstärke: Herstellung, Modifizierung und Verwendungen; von Knight und Oson; und Kapitel XVI, Seite 507 bis 528: Reisstärke: Herstellung und Verwendungen; von Rohmer und Klem; Maisstärke: Eckhoff et al., Cereal Chem. 73 (1996), 54-57, die Extraktion von Maisstärke im industriellen Maßstab wird in der Regel durch das so genannte "wet
25 milling" erreicht.). Vorrichtungen, die für gewöhnlich bei Verfahren zur Extraktion von Stärke von Pflanzenmaterial verwendet werden, sind Separatoren, Dekanter, Hydrocyclone, Sprühtrockner und Wirbelschichttrockner.

Unter dem Begriff „Stärke speichernde Teile“ sollen im Zusammenhang mit der
30 vorliegenden Erfindung solche Teile einer Pflanze verstanden werden, in welchen Stärke, im Gegensatz zu transitorischer Blattstärke, zur Überdauerung von längeren Zeiträumen als Depot gespeichert wird. Bevorzugte Stärke speichernde Pflanzenteile

sind z.B. Knollen, Speicherwurzeln und Körner, besonders bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm, insbesondere bevorzugt sind Körner enthaltend ein Endosperm von Mais- oder Weizenpflanzen.

- 5 Modifizierte Stärke, erhältlich nach einem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung modifizierter Stärke, ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei den erfindungsgemäßen modifizierten Stärken um native Stärken.

Der Begriff „native Stärke“ bedeutet im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung, dass die Stärke nach dem Fachmann bekannten Methoden aus erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßem erntebaren Pflanzenteilen, 15 erfindungsgemäßen Stärke speichernden Teilen oder erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial von Pflanzen isoliert wird.

Weiterhin ist die Verwendung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßer Pflanzen zur Herstellung einer modifizierten Stärke Gegenstand 20 der vorliegenden Erfindung.

Dem Fachmann ist bekannt, dass die Eigenschaften von Stärke durch z.B. thermische, chemische, enzymatische oder mechanische Derivatisierung verändert werden können. Derivatisierte Stärken sind für verschiedene Anwendungen im 25 Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich besonders geeignet. Die erfindungsgemäßen Stärken sind als Ausgangssubstanz besser geeignet zur Herstellung von derivatisierten Stärken als herkömmliche Stärken, dass sie durch den höheren Gehalt an Stärkephosphat einen höheren Anteil an reaktiven funktionalen Gruppen aufweisen.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin erfindungsgemäße modifizierte Stärke, nachträglich derivatisiert wird.

5 Unter dem Begriff „derivatisierte Stärke“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung eine erfindungsgemäße modifizierte Stärke verstanden werden, deren Eigenschaften nach der Isolierung aus pflanzlichen Zellen mit Hilfe von chemischen, enzymatischen, thermischen oder mechanischen Verfahren verändert wurde.

10 In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei der erfindungsgemäßen derivatisierten Stärke um mit Hitze und/oder mit Säure behandelte Stärke.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um
15 Stärkeether, insbesondere um Stärke-Alkylether, O-Allylether, Hydroxylalkylether, O-Carboxylmethylether, stickstoffhaltige Stärkeether, phosphathaltige Stärkeether oder schwefelhaltige Stärkeether.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um
20 vernetzte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärke-Pfropf-Polymerisate.

25 In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um oxidierte Stärken.

In einer weiteren Ausführungsform handelt es sich bei den derivatisierten Stärken um Stärkeester, insbesondere um Stärkeester, die unter Verwendung von organischen
30 Säuren in die Stärke eingeführt wurden. Besonders bevorzugt handelt es sich um Phosphat-, Nitrat-, Sulfat-, Xanthat-, Acetat- oder Citratstärken.

Die erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken eignen sich für verschiedene Verwendungen in der Pharmaindustrie, im Nahrungsmittel- und/oder Nicht-Nahrungsmittelbereich. Methoden zur Herstellung von erfindungsgemäßen derivatisierten Stärken sind dem Fachmann bekannt und in der allgemeinen Literatur
5 ausreichend beschrieben. Eine Übersicht zur Herstellung von derivatisierten Stärken findet sich z.B. bei Orthoefer (in Corn, Chemistry and Technology, 1987, eds. Watson und Ramstad, Chapter 16, 479-499).

Derivatisierte Stärke, erhältlich nach dem erfindungsgemäßen Verfahren zur
10 Herstellung einer derivatisierten Stärke ist ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Ferner ist die Verwendung erfindungsgemäßer modifizierter Stärken zur Herstellung von derivatisierter Stärke Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15

Stärke speichernde Teile von Pflanzen werden oft zu Mehlen verarbeitet. Beispiele für Teile von Pflanzen, aus welchen Mehle hergestellt werden, sind z.B. Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Getreidepflanzen. Zur Herstellung von Mehlen aus Getreidepflanzen werden die endospermhaltigen Körner dieser Pflanzen gemahlen
20 und gesiebt. Stärke ist ein Hauptbestandteil des Endosperms. Bei anderen Pflanzen, die kein Endosperm, sondern andere Stärke speichernde Teile, wie z.B. Knollen oder Wurzeln enthalten, wird Mehl häufig durch Zerkleinern, Trocknen und anschließendem Mahlen der betreffenden Speicherorgane hergestellt. Die Stärke des Endosperms oder enthaltend in Stärke speichernden Teilen von Pflanzen ist ein
25 wesentlicher Anteil des Mehls, welches aus den betreffenden Pflanzenteilen hergestellt wird. Die Eigenschaften von Mehlen werden daher auch durch die in dem betreffenden Mehl vorliegende Stärke beeinflusst. Erfindungsgemäße Pflanzenzellen und erfindungsgemäße Pflanzen synthetisieren eine veränderte Stärke im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. nicht
30 genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzen. Mehle, hergestellt aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßen erntebaren Teilen weisen daher

veränderte Eigenschaften auf. Die Eigenschaften von Mehlen können auch durch Mischen von Stärke mit Mehlen oder durch das Mischen von Mehlen mit unterschiedlichen Eigenschaften beeinflusst werden.

- 5 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft daher Mehle, enthaltend eine erfindungsgemäße Stärke.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft Mehle, die aus erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, aus Stärke
10 speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, aus erfindungsgemäßigem Vermehrungsmaterial oder aus erfindungsgemäßen erntebaren Pflanzenteilen hergestellt sind. Bevorzugte Stärke speichernde Teile erfindungsgemäßer Pflanzen sind Knollen, Speicherwurzeln und ein Endosperm enthaltende Körner. Vorzugsweise stammen Knollen von Kartoffelpflanzen und Körner von Pflanzen der
15 (systematischen) Familie *Poaceae*, besonders bevorzugt stammen Körner von Mais- oder Weizenpflanzen.

- Unter dem Begriff „Mehl“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein durch Mahlen von Pflanzenteilen erhaltenes Pulver verstanden werden.
20 Gegebenenfalls werden Pflanzenteile vor dem Mahlen getrocknet und nach dem Mahlen zerkleinert und/oder gesiebt.

- Erfindungsgemäße Mehle zeichnen sich auf Grund der in ihnen vorliegenden Stärke, die einen veränderten Phosphatgehalt und/oder eine veränderte Phosphatverteilung
25 aufweisen insbesondere durch ihr erhöhtes Wasserbindevermögen aus. Diese ist z.B. bei der Verarbeitung von Mehlen in der Lebensmittelindustrie für viele Anwendungen, insbesondere bei der Herstellung von Backwaren gewünscht.

- Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur
30 Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen, erfindungsgemäßen Pflanzen, von Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen

Pflanzen, erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder erfindungsgemäßem erntebarem Material.

5 Mehle können durch Mahlen von Stärke speichernden Teilen von erfindungsgemäßen hergestellt werden. Dem Fachmann ist bekannt, wie er Mehle herstellt. Vorzugsweise umfasst ein Verfahren zur Herstellung von Mehlen auch den Schritt des Erntens der kultivierten Pflanzen bzw. Pflanzenteile und/oder des Vermehrungsmaterials bzw. der Stärke speichernden Teile dieser Pflanzen vor dem Mahlen und besonders bevorzugt ferner den Schritt der Kultivierung
10 erfindungsgemäßer Pflanzen vor dem Ernten.

Unter dem Begriff „Teile von Pflanzen“ sollen im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung alle Teile der Pflanze verstanden werden, die als Bestandteile in ihrer Gesamtheit eine vollständige Pflanze darstellen. Teile von
15 Pflanzen sind z.B. Sprosse, Blätter, Rhizome, Wurzeln, Rüben, Knollen, Schoten, Samen oder Körner.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen eine Prozessierung von erfindungsgemäßen
20 Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßem erntebarem Material vor dem Mahlen.

Die Prozessierung kann dabei z.B. eine Hitzebehandlung und/oder eine Trocknung sein. Hitzebehandlung gefolgt von einer Trocknung des Hitze behandelten Materials
25 wird z.B. bei der Herstellung von Mehlen aus Speicherwurzeln oder Knollen wie z.B. aus Kartoffelknollen angewendet, bevor die das Mahlen erfolgt. Die Zerkleinerung von erfindungsgemäßen Pflanzen, von Stärke speichernden Teilen erfindungsgemäßer Pflanzen, von erfindungsgemäßem Vermehrungsmaterial oder von erfindungsgemäßem erntebarem Material vor dem Mahlen kann ebenfalls eine
30 Przessierung im Sinne der vorleigenden Erfindung darstellen. Die Entfernung von pflanzlichem Gewebe, wie z.B. von Spelzen der Körner, vor dem Mahlen stellt auch eine Prozessierung vor dem Mahlen in Sinnne der vorleigendenm Erfindung dar.

In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung umfasst das Verfahren zur Herstellung von Mehlen nach dem Mahlen eine Prozessierung des Mahlgutes.

- 5 Das Mahlgut kann dabei z.B. nach dem Mahlen gesiebt werden, um z.B. verschiedene Typenmehle herzustellen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen genetisch modifizierten Pflanzenzellen oder erfindungsgemäßen
10 Pflanzen zur Herstellung von Mehlen.

Es ist auch Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel, wie z.B. DNA Moleküle zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und erfindungsgemäßen Pflanzen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen
15 bzw. Wildtyp-Pflanzen eine modifizierte Stärke synthetisieren, zur Verfügung zu stellen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung auch Nucleinsäuremoleküle, codierend für ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines OK1 Proteins, ausgewählt aus der
20 Gruppe bestehend aus

- a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
- b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, das die Aminosäuresequenz umfasst, die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder der Insertion in
25 Plasmid pMI50 codiert wird;
- c) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweisen;
- d) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Sequenz eine
30 Identität von mindestens 60% zu der Aminosäuresequenz aufweist; die von der Insertion in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder von der Insertion in Plasmid DSM pMI50 codiert wird;

- e) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID NO 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine komplementäre Sequenz umfassen;
- f) Nucleinsäuremolekülen, die die Nucleotidsequenz der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 enthaltenen Insertion umfassen;
- 5 g) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 70% aufweisen;
- i) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), b), e) oder f) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
- 10 h) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a), b), e) oder f) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und
- j) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e), f), g), h) oder i) genannten Nucleinsäuremoleküle
- 15 darstellen.

Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können grundsätzlich aus jeder Pflanze stammen, vorzugsweise stammen sie aus Stärke speichernden Pflanzen, bevorzugt aus Kartoffel-, Gerste-, Sorghum-, Gerste-, Weizen oder Reispflanzen, besonders bevorzugt aus *Arabidopsis*- oder Reispflanzen, insbesondere besonders bevorzugt aus *Oryza sativa*.

Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuremoleküle von mindestens 21, vorzugsweise mehr als 50 und besonders bevorzugt mehr als 200 Nucleotiden Länge, die spezifisch mit mindestens einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül hybridisieren. Spezifisch hybridisieren bedeutet hierbei, dass diese Moleküle mit Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, die ein erfindungsgemäßes Protein codieren, jedoch nicht mit Nucleinsäuremolekülen, die andere Proteine codieren. Insbesondere betrifft die Erfindung solche Nucleinsäuremoleküle, die mit Transkripten von erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren und dadurch deren Translation verhindern können. Solche Nucleinsäuremoleküle, die spezifisch mit den erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen hybridisieren, können

beispielsweise Bestandteile von antisense-, RNAi-, Cosuppressions-Konstrukten oder Ribozymen sein oder können als Primer für die Amplifikation mittels PCR verwendet werden.

- 5 Weiterhin betrifft die Erfindung rekombinante Nucleinsäuremoleküle enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül.

- Unter dem Begriff „rekombinantes Nukleinsäuremolekül“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ein Nukleinsäuremolekül verstanden werden, welches
- 10 neben erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen zusätzliche Sequenzen enthält, welche natürlicherweise nicht in einer Kombination vorliegen, wie sie in erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuren vorliegen. Die genannten zusätzlichen Sequenzen können dabei beliebige Sequenzen sein, bevorzugt handelt es sich dabei um regulatorische Sequenzen (Promotoren, Terminationssignale,
- 15 Enhancer), besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen, die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, besonders bevorzugt um regulatorische Sequenzen die in pflanzlichem Gewebe aktiv sind, in welchen Speicherstärke synthetisiert wird. Methoden zur Erzeugung erfindungsgemäßer rekombinanter Nucleinsäuremoleküle sind dem Fachmann bekannt und umfassen gentechnische Methoden wie z.B. die
- 20 Verbindung von Nucleinsäuremolekülen durch Ligation, genetische Rekombination oder die Neusynthese von Nucleinsäuremolekülen (siehe z.B. Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY. ISBN: 0879695773, Ausubel et al., Short Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons; 5th edition (2002), ISBN:
- 25 0471250929).

- Eine weitere Ausführungsform von erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekülen der vorliegenden Erfindung sind Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren, Bacteriophagen und andere in der Gentechnik gängige
- 30 Vektoren, die die oben beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle enthalten.

In einer weiteren Ausführungsform sind die in den Vektoren enthaltenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle verknüpft mit regulatorischen Sequenzen, die die Expression in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren. Der Begriff "Expression" kann dabei Transkription als auch Transkription und Translation bedeuten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle können dabei zu den regulatorischen Sequenzen in „sense“-Orientierung, und/oder in „antisense“-Orientierung vorliegen.

Regulatorische Sequenzen zur Expression in prokaryontischen Organismen, z.B. *E. coli*, und in eukaryontischen Organismen sind ausreichend in der Literatur beschrieben, insbesondere solche zur Expression in Hefe, wie z. B. *Saccharomyces cerevisiae*. Eine Übersicht verschiedener Systeme zur Expression für Proteine in verschiedenen Wirtsorganismen findet man z. B. in *Methods in Enzymology* 153 (1987), 383-516 und in Bitter et al. (*Methods in Enzymology* 153 (1987), 516-544).

15

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine Wirtszelle, insbesondere eine prokaryontische oder eukaryontische Zelle, die genetisch modifiziert ist mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül und/oder mit einem erfindungsgemäßen Vektor, sowie Zellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die die erfindungsgemäße genetische Modifikation enthalten.

20

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die Erfindung Wirtszellen, insbesondere prokaryontische oder eukaryontische Zellen, die mit einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül oder einem erfindungsgemäßen Vektor transformiert wurden, sowie Wirtszellen, die von derartigen Wirtszellen abstammen und die beschriebenen erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle oder Vektoren enthalten.

25

Die Wirtszellen können Bakterien- (z.B. *E. coli*, Bakterien der Gattung *Agrobacterium* insbesondere *Agrobacterium tumefaciens* oder *Agrobacterium rhizogenes*) oder Pilzzellen (z.B. Hefe, insbesondere *S. cerevisiae*, *Agaricus*, insbesondere *Agaricus bisporus*, *Aspergillus*, *Trichoderma*), sowie pflanzliche oder tierische Zellen sein. Der Begriff "transformiert" bedeutet dabei, dass die erfindungsgemäßen Zellen mit einem

30

erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül genetisch modifiziert sind insofern, als sie zusätzlich zu ihrem natürlichen Genom mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül enthalten. Dieses kann in der Zelle frei, gegebenenfalls als selbstreplizierendes Molekül, vorliegen oder es kann stabil in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegen.

Vorzugsweise sind die Wirtszellen Mikroorganismen. Darunter werden im Rahmen der vorliegenden Anmeldung alle Bakterien und alle Protisten (z. B. Pilze, insbesondere Hefen und Algen) verstanden, so wie sie z. B. in Schlegel "Allgemeine Mikrobiologie" (Georg Thieme Verlag (1985), 1-2) definiert sind.

Bevorzugt sind die erfindungsgemäßen Wirtszellen Pflanzenzellen. Dabei kann es sich prinzipiell um Pflanzenzellen aus jeder beliebigen Pflanzenspezies handeln, d.h. sowohl monokotyle als auch dikotyle Pflanzen. Bevorzugt handelt es sich um Pflanzenzellen aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen, d.h. aus Pflanzen, die vom Menschen kultiviert werden für Zwecke der Ernährung oder für technische, insbesondere industrielle Zwecke. Vorzugsweise betrifft die Erfindung Pflanzenzellen und Pflanzen aus stärke-speichernden Pflanzen (Mais, Reis, Weizen, Roggen, Hafer, Gerste, Maniok, Kartoffel, Sago, Mungbohne, Erbse oder Sorghum), bevorzugt Pflanzenzellen aus Pflanzen der (systematischen) Familie *Poacea*, insbesondere bevorzugt sind Pflanzenzellen aus Mais- oder Weizenpflanzen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor. Bevorzugt sind erfindungsgemäße Zusammensetzungen, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Wirtszelle. Besonders bevorzugt handelt es sich bei der Wirtszelle um eine Pflanzenzelle, insbesondere bevorzugt um eine Zelle einer Mais- oder Weizenpflanze.

Ein weiterer Aspekt erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft Zusammensetzungen, die zur Erzeugung von erfindungsgemäßen Wirtszellen,

bevorzugt zur Erzeugung erfindungsgemäßer Pflanzenzellen verwendet werden können. Bevorzugt handelt es sich hierbei um eine Zusammensetzung, enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und
5 einen biolistischen Träger, welcher zur Einführung eines erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküls in eine Wirtszelle geeignet ist. Bevorzugte biolistische Träger sind Partikel aus Wolfram, Gold oder Kunststoffen.

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft
10 Zusammensetzungen enthaltend ein erfindungsgemäßes Nucleinsäuremolekül, ein erfindungsgemäßes rekombinantes Nucleinsäuremolekül oder einen erfindungsgemäßen Vektor und eine Pflanzenzelle und ein synthetisches Kulturmedium. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen neben erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekülen, Pflanzenzellen und synthetischem
15 Kulturmedium auch Polyethylenglykol (PEG). Bei diesen Zusammensetzungen liegt das erfindungsgemäße rekombinante Nucleinsäuremolekül außerhalb der Pflanzenzelle vor, d.h. es befindet sich außerhalb des von einer Cytoplasmamembran umschlossenen Zellinneren der Pflanzenzelle.
Synthetische Kulturmedien, die zur Kultivierung und/oder zur Transformation von
20 Pflanzenzellen geeignet sind, sind dem Fachmann bekannt und z.B. ausreichend in der Literatur beschrieben. Viele unterschiedliche synthetische Kulturmedien sind auch im Fachhandel käuflich erwerbbar (z.B. DUCHEFA Biochemie B.V., Belgien).

Eine weitere Ausführungsform erfindungsgemäßer Zusammensetzungen betrifft
25 Zusammensetzungen, die zur Identifizierung erfindungsgemäßer Nucleinsäuren verwendet werden. Bevorzugt enthalten solche Zusammensetzungen neben einem erfindungsgemäßen Nucleinsäuremolekül, erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremolekül oder erfindungsgemäßen Vektor weitere Nucleinsäuremoleküle, insbesondere Nucleinsäuremoleküle pflanzlichen Ursprungs,
30 die in Form von genomischer DNA, mRNA oder als als Klone in sogenannten DNA-Bibliotheken vorliegen können. Bevorzugt sind DNA-Bibliotheken, welche als Cosmide, Phagmide, Plasmide, YACs oder BACs vorliegen. Die DNA-Bibliotheken

können sowohl genomische, als auch cDNA enthalten. Die erfindungsgemäßen Nucleinsäuremoleküle, erfindungsgemäßen rekombinanten Nucleinsäuremoleküle oder einen erfindungsgemäßen Vektoren werden in diesen Zusammensetzungen bevorzugt als Hybridisierungsprobe eingesetzt.

5

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Protein, welches eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist und phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt. Bevorzugt handelt es sich dabei um ein Protein, welches eine phosphorylierte-Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist und phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt.

10

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt und einen Phosphatrest von ATP auf phosphorylierte-alpha-Stärke überträgt.

15

Bevorzugt überträgt ein erfindungsgemäßes Protein den beta-Phosphatrest von ATP auf phosphorylierte-Stärke. Besonders bevorzugt überträgt ein erfindungsgemäßes Protein den beta-Phosphatrest des ATP auf phosphorylierte-Stärke und den gamma-Phosphatrest von ATP auf Wasser und besitzt daher die Aktivität einer [phosphoryliertes-alpha-1,4-Glucan]-Wasser-Dikinase bzw. [phosphorylierte-Stärke]-

20

Wasser-Dikinase.

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches bei der Übertragung eines Phosphatrestes auf phosphorylierte-Stärke als phosphoryliertes Zwischenprodukt anfällt.

25

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches eine erhöhte Bindungsaktivität zu phosphorylierter-Stärke, im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist.

30

Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches mehr zusätzliche Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position im Vergleich zu

Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle einer phosphorylierten-Stärke einführt.

Vorzugsweise werden von einem erfindungsgemäßen Protein mindestens 30%, bevorzugt mindestens 60%, besonders bevorzugt mindestens 90% und
5 insbesondere bevorzugt mindestens 120% mehr Phosphatmonoesterbindungen in C-3-Position der Glucosemoleküle einer phosphorylierten-Stärke im Vergleich zu Phosphatmonoesterbindungen in C-6-Position der Glucosemoleküle. einer phosphorylierten-Stärke eingeführt.

10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches ein von der Aminosäuresequenz abgeleitetes Molekulargewicht von 120 kDa bis 145 kDa, bevorzugt von 120 kDa bis 140 kDa, besonders bevorzugt von 125 kDa bis 140 kDa, insbesondere bevorzugt von 130 kDa bis 135 kDa aufweist.

15 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, welches eine Phosphohistidindomäne aufweist. Bevorzugt enthält die Phosphohistidindomäne zwei Histidinreste.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind erfindungsgemäße
20 Proteine, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus

- a) Proteinen, die die unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebene Aminosäuresequenz umfassen;
- b) Proteinen, die durch die codierende Region der im Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder pMI50 inserierten DNA codiert werden; oder
- 25 c) Proteinen, die zu der Aminosäuresequenz der unter a) oder b) genannten Proteine eine Identität von mindestens 60% aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung Proteine mit phosphorylierter-Stärke phosphorylierender Aktivität, wobei das codierte Protein eine
30 Identität von mindestens 70% bevorzugt von mindestens 80%, besonders bevorzugt von mindestens 90% und insbesondere bevorzugt von 95% zu der unter SEQ ID NO 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz oder zu der von der Insertion

in Plasmid A.t.-OK1-pGEM oder Plasmid pMI50 codierten Aminosäuresequenz eines OK1 Proteins aufweist.

5 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein erfindungsgemäßes Protein, dadurch charakterisiert, dass die das Protein codierende Aminosäuresequenz eine Phosphohistidindomäne aufweist. Vorzugsweise weist das erfindungsgemäße Protein eine Phosphohistidindomäne auf, die zu der in SEQ ID NO 5 dargestellten Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 50%, insbesondere von mindestens 60%, bevorzugt von mindestens 70% und besonders bevorzugt von mindestens 80% und insbesondere bevorzugt von mindestens 90% auf.

15 In einer weiteren Ausführungsform betrifft die vorliegende Erfindung ein erfindungsgemäßes Protein, wobei das Protein aus einer *Arabidopsis*- oder einer Reispflanze stammt.

20 Eine weitere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung betrifft ein Protein, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-alpha-1,4-Stärke, im Vergleich zu nicht-phosphorylierter Stärke aufweist, worin die Bindungsaktivität zu P-Stärke mindestens 3-fach, bevorzugt mindestens 4-fach, besonders bevorzugt mindestens 5-fach und insbesondere bevorzugt mindestens 6-fach erhöht ist im Vergleich zur Bindungsaktivität zu nicht-phosphorylierter-Stärke.

25 Die Erfindung betrifft in einer weiteren Ausführungsform auch Proteine, die durch erfindungsgemäße Nucleinsäuremoleküle codiert werden.

Beschreibung der Sequenzen

30 SEQ ID NO 1: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des A.t.-OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist den Vektoren A.t.-pGEM und OK1-pDEST17 und inseriert.

SEQ ID NO 2: Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 1 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

5 SEQ ID NO 3: Nucleinsäuresequenz enthaltend die codierende Region des O.s.-OK1 Proteins aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist dem Vektor pMI50 inseriert.

SEQ ID NO 4: Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein aus *Oryza sativa*. Diese Sequenz ist von der unter SEQ ID NO 3 dargestellten Nucleinsäuresequenz ableitbar.

10 SEQ ID NO 5: Peptidsequenz codierend die Phosphohistidindomäne der OK1 Proteine aus *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*.

Beschreibung der Abbildungen

Fig. 1: Denaturierendes Acrylamidgel zur Identifizierung von Proteinen aus *Arabidopsis thaliana*, die bevorzugt an nicht-phosphorylierte-Stärke im Vergleich zu phosphorylierter-Stärke binden. In Spur „M“ ist ein Standard Protein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. In Spur „-“ sind Proteine, erhalten nach Inkubation des Kontrollansatzes C aus Beispiel 1 d) aufgetragen. In Spur „K“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz B, Beispiel 1 d)), aufgetragen. In Spur „P“ sind Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Inkubation mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz A, Beispiel 1 d)) aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Acrylamidgel mit Comassie Blau gefärbt.

25

Fig. 2: Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 2 A) stellt ein nach erfolgter Elektrophorese mit Comassie Blau gefärbtes denaturierendes (SDS) Acrylamidgel dar. Fig. 2 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen Mengen aufgetragen. M: Standard Protein Molekulargewichtsmarker; R1: Probe aus Reaktionsgefäß 1 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP); R2:

30

Probe aus Reaktionsgefäß 2 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein auf 95°C erhitzt); R3: Probe aus Reaktionsgefäß 3 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein in 0,5 M HCl inkubiert); R4: Probe aus Reaktionsgefäß 4 nach Beispiel 7 (nach Inkubation eines OK1 Proteins mit ATP wurde das Protein mit 0,5 M NaOH inkubiert).

Fig. 3: Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität eines OK1 Proteins (siehe Beispiel 6). OK1 Protein wurde mit nicht-phosphorylierter-Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante (Ansatz A) und Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde (Ansatz B) inkubiert. Ansatz C entspricht Ansatz B, außer dass dieser Ansatz C ohne OK1 Protein inkubiert wurde. Für jeden Ansatz (A, B, C) wurden je zwei unabhängige Versuche durchgeführt (Versuch 1 und Versuch 2). Graphisch dargestellt sind die jeweiligen Mengen, gemessen in cpm (Counts per minute), an ^{33}P markiertem Phosphat, welches von dem OK1 Protein in nicht-phosphorylierte-Stärke (Ansatz A) und phosphorylierte Stärke (Ansatz B) eingeführt wurde.

Fig. 4: Vergleich der C-Atom-Positionen von Glucosemolekülen der Stärke, die von einem R1 Protein bzw. einem OK1 Protein phosphoryliert werden (siehe Beispiel 9). OK1 Protein (Ansatz A) wurde in Anwesenheit von mit ^{33}P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, die nachträglich *in vitro* mit einem R1 Protein phosphoryliert wurde, inkubiert.). R1 Protein (Ansatz B) wurde in Anwesenheit von mit ^{33}P markierten ATP mit Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde eine Totalhydrolyse der Stärke durchgeführt und die erhaltenen Hydrolyseprodukte mittels HPAE Chromatographie aufgetrennt. Als Standard wurden den Hydrolyseprodukten vor der Auftrennung Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat zugegeben. Die mittels HPAE Chromatographie aufgetrennten Hydrolyseprodukte wurden in einzelnen Fraktionen aufgesammelt. Mit Fraktion 15 eluierte das zugegebene Glucose-6-Phosphat und mit Fraktion 17 das zugegebene Glucose-3-Phosphat. Die erhaltenen Fraktionen wurden anschließend

auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht. Die in den einzelnen Fraktionen gemessene Menge an ^{33}P markiertem Phosphat, gemessen in cpm (Counts per minute), welches von dem OK1 Protein oder dem R1 Protein jeweils in die Hydrolyseprodukte der phosphorylierten-Stärke eingeführt wurde, ist graphisch
5 dargestellt.

Fig. 5 Nachweis der Autophosphorylierung des OK1 Proteins. Fig. 5 A) stellt einen Western Blot dar. Fig. 5 B) zeigt die Autoradiographie eines denaturierenden (SDS) Acrylamidgels. Auf beide Gele wurden jeweils die gleichen Proben zu gleichen
10 Mengen aufgetragen. Das OK1 Protein wurde entweder mit randomisiertem radioaktiv markiertem ATP oder mit spezifisch in gamma-Position radioaktiv markiertem ATP inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurden die Proteine entweder auf 30°C oder 95°C erhitzt, oder in 0,5 M NaOH bzw. 0,5 M HCl inkubiert.

15 Fig. 6 Nachweis der Übertragung des beta-Phosphatrestes von ATP auf Stärke in einer von einem OK1 Protein katalysierten Reaktion. Es wurde zur Phosphorylierung von mittels eines R1 Proteins *in vitro* phosphorylierter Stärke, isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante, durch ein OK1 Protein entweder spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertes ATP oder
20 randomisiertes ^{33}P ATP eingesetzt. In den jeweiligen mit „control“ bezeichneten Experimenten wurde kein OK1 Protein zugegeben. Jeder Versuchsansatz wurde zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die Ergebnisse beider Versuche sind dargestellt.

25

Allgemeine Methoden

Im Folgenden werden Methoden beschrieben, welche zur Durchführung der
30 erfindungsgemäßen Verfahren verwendet werden können. Diese Methoden stellen konkrete Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung dar, beschränken die vorliegende Erfindung jedoch nicht auf diese Methoden. Dem Fachmann ist bekannt,

dass er durch Modifikation der beschriebenen Methoden und/oder durch Ersetzen einzelner Methodenteile durch alternative Methodenteile die Erfindung in gleicher Weise ausführen kann.

5 1. **Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Gewebe**

a) Herstellung von Proteinextrakten aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und daraufhin im Mörser unter flüssigem Stickstoff homogenisiert. Das zerkleinerte Blattmaterial wird mit dem ca. 3,5-fachen Volumen (bezogen auf das Gewicht des
10 eingesetzten Blattmaterials) kaltem (4°C) Bindungspuffer versetzt und für 2x 10 s mit einem Ultraturrax (maximale Geschwindigkeit) aufgeschlossen. Nach der ersten Behandlung mit einem Ultraturrax wird das zerkleinerte Blattmaterial auf Eis abgekühlt, bevor die zweite Behandlung erfolgt. Anschließend wird das behandelte Blattmaterial durch ein 100 µm Nylonnetz gegeben und 20 min zentrifugiert (50 ml
15 Zentrifugengefäß, 20.000xg, 4°C).

b) Ausfällen der in den Proteinextrakten enthaltenen Proteine

Der nach Zentrifugation nach Schritt a) erhaltene Überstand wird abgenommen und sein Volumen bestimmt. Für das Ausfällen von Proteinen wird Ammoniumsulfat über
20 einen Zeitraum von 30 Minuten kontinuierlich unter Rühren auf Eis bis zu einer Endkonzentration von 75% (Gewicht/Volumen) dem Überstand zugegeben. Anschließend wird der Überstand für eine weitere Stunde auf Eis unter Rühren inkubiert. Die aus dem Überstand ausgefällten Proteine werden bei 20.000xg und 4°C für 10 min pelletiert und das Pellet anschließend in 5 ml Bindungspuffer
25 aufgenommen, d.h. die im Pellet vorliegenden Proteine werden in Lösung gebracht.

c) Entsalzen der ausgefällten Proteine

Die gelösten Proteine werden mittels einer mit Sephadex G25 gefüllten PD10-Säule (Amersham Bioscience, Freiburg, Prod. Nr. Säulen: 17-0851-01, Prod. Nr. Sephadex
30 G25-M: 17-0033-01) bei einer Temperatur von 4°C entsalzt, d.h. auch das zur Ausfällung unter Schritt b) verwendete Ammoniumsulfat wird von den gelösten

Proteinen abgetrennt. Die PD10-Säule wird vor dem Auftragen der nach Schritt b) in Lösung gebrachten Proteine mit Bindungspuffer äquilibriert. Dazu werden fünfmal jeweils 5 ml Bindungspuffer über die Säule gegeben. Anschließend werden pro Säule 2,5 ml der nach Schritt b) erhaltenen Proteinlösung auf die Säule gegeben, bevor Proteine mit 3,5 ml Bindungspuffer von der Säule eluiert werden.

d) Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wird mit einem Bradford-Essay (Biorad, München, Prod. Nr. 500-0006 bestimmt (Bradford, 1976, Anal. Biochem. 72, 248-254).

10

e) Zusammensetzung des Bindungspuffers [

Bindungspuffer:	50 mM	HEPES/NaOH (od. KOH), pH 7.2
	1 mM	EDTA
	2 mM	<u>Dithioerythritol (DTE)</u>
	2 mM	Benzamidin
	2 mM	ϵ -Aminocapronsäure
	0.5 mM	PMSF
	0.02 %	Triton X-100

15

2. Isolierung von Blattstärke

20 a) Isolierung von Stärkegranula aus pflanzlichen Geweben

Blattmaterial wird sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Blattmaterial wird im Mörser portionsweise unter flüssigem Stickstoff homogenisiert und in insgesamt dem ca. 2,5-fachen Volumen (Gewicht/Volumen) Stärkepuffer aufgenommen. Diese Suspension wird zusätzlich noch einmal im Waring Blendor für 20 s bei maximaler Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisat wird durch ein Nylonnetz (100 μ m Maschenweite) gegeben und 5 Minuten bei 1.000xg zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wird verworfen.

25

b) Reinigung der Stärke, isoliert aus pflanzlichen Geweben

Das nach Schritt a) erhaltene Stärke enthaltende Pellet wird nach Entfernen des auf der Stärke oben aufliegenden grünen Materials durch abspülen des grünen Materials

30

mit Stärkepuffer in Stärkepuffer aufgenommen und sukzessive durch Nylonnetze unterschiedlicher Maschenweite (in der Reihenfolge 60 μm , 30 μm , 20 μm) gegeben. Das Filtrat wird über ein 10 ml Percoll-Kissen (95% (v/v) Percoll (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 5% (v/v) 0,5M HEPES-KOH pH7,2) zentrifugiert (Correx-
5 Röhrchen, 15 min, 2.000xg) zentrifugiert. Das nach dieser Zentrifugation erhaltene Sediment wird einmal in Stärkepuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (5 min, 1.000xg,).

c) Entfernen der an die Stärke gebundenen Proteine

10 Nach Schritt b) werden Stärkegranula erhalten, welche an Stärke bindende Proteine enthalten. Die an die Oberfläche der Stärkegranula gebundenen Proteine werden durch viermalige Inkubation mit 0,5 % SDS (Natriumlaurylsulfat) für jeweils 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei ein Zentrifugation (5 min, 5.000xg), um die Stärkegranula vom
15 betreffenden Waschpuffer abzutrennen.

d) Reinigung von Proteinen befreiter Stärke

Die nach Schritt c) erhaltene, von an ihre Oberfläche bindenden Proteinen befreiten Stärke, wird anschließend durch viermaliges Inkubieren mit Waschpuffer für jeweils
20 10-15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln entfernt. Nach jedem Waschschrift erfolgt dabei eine Zentrifugation (5 min, 1.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden Waschpuffer abzutrennen. Diese Reinigungsschritte dienen vor allem der Entfernung des bei Inkubationen nach Schritt c) eingesetzten SDS.

25 e) Bestimmung der Konzentration von isolierter Stärke

Die Menge der Stärke, isoliert nach Schritt d) wird photometrisch bestimmt. Die optische Dichte der Stärkesuspension wird nach geeigneter Verdünnung gegen eine Eichgerade bei einer Wellenlänge von 600 nm gemessen. Der lineare Bereich der Eichgerade befindet sich zwischen 0 und 0,3 Extinktionseinheiten.

30 Zur Erstellung der Eichgeraden wird Stärke, z.B. isoliert aus Blättern einer *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutante unter Vakuum getrocknet, gewogen und in einem definierten Volumen Wasser aufgenommen. Die so erhaltene Suspension wird

in mehreren Schritten jeweils im Verhältnis 1 zu 1 mit Wasser verdünnt, bis man eine Suspension von ca. 5 µg Stärke pro ml Wasser enthält. Die durch die einzelnen Verdünnungsschritte erhaltenen Suspensionen werden im Photometer bei einer Wellenlänge von 600 nm vermessen. Die für die jeweiligen Suspensionen erhaltenen Absorptionswerte werden gegen die in der jeweiligen Suspension vorliegende Konzentration der Stärke aufgetragen. Die erhaltene Eichgerade sollte in dem Bereich von 0 µg Stärke pro ml Wasser bis 0,3 µg Stärke pro ml Wasser einer linearen mathematischen Funktion folgen.

10 f) Aufbewahrung isolierter Stärke

Die Stärke kann entweder direkt, ohne weitere Lagerung für weitere Versuche verwendet werden, oder in Aliquots in 1,5 mL Eppendorfgefäßen bei -20°C gelagert werden. Sowohl die eingefrorene Stärke, als auch nicht gelagerte, frisch isolierte Stärke kann gegebenenfalls z.B. für die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen

15 Methoden betreffend *in vitro*-Phosphorylierung und/oder Bindungstest eingesetzt werden.

g) Zusammensetzung von verwendeten Puffern

1x Stärkepuffer: 20 mM HEPES-KOH, pH 8.0

20 0.2 mM EDTA

0.5 % Triton X-100

Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

25 3. Rekombinante Expression eines identifizierten Stärke phosphorylierenden Proteins

a) Herstellung eines bakteriellen Expressionsvektors enthaltend eine cDNA, die ein Stärke phosphorylierendes Protein codiert.

Die cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann z.B. unter

30 Verwendung von mRNA oder poly-A-plus-mRNA aus pflanzlichen Geweben als „Template“ mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert werden. Dazu wird

zunächst eine reverse-Transkriptase für die Herstellung eines zur einem Stärke phosphorylierenden Protein codierenden mRNA komplementären cDNA Stranges verwendet, bevor der betreffende cDNA Strang mittels DNA-Polymerase amplifiziert wird. So genannte „Kits“ enthaltend Substanzen, Enzyme und Anleitungen zur

5 Durchführung von PCR Reaktionen sind käuflich erwerbbar (z.B. SuperScript™ One-Step RT-PCR System, Invitrogen, Prod. Nr.: 10928-034. Die amplifizierte cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein kann anschließend in einen bakteriellen Expressionsvektor, z.B. pDEST™17 (Invitrogen) kloniert werden. pDEST™17 enthält den T7 Promotor, der zur Initiation der Transkription von der T7-

10 RNA-Polymerase verwendet wird. Weiterhin enthält der Expressionsvektor pDEST™17 in 5'-Richtung vom T7 Promotor eine Shine Dalgarno Sequenz gefolgt von einem Start-Codon (ATG) und von einem so genannten His-tag. Dieser His-tag besteht aus sechs direkt hintereinander folgenden Codons, die jeweils die Aminosäure Histidin codieren und befindet sich in dem Leseramen des genannten

15 Start Codons. Die Klonierung einer cDNA, codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein in pDEST™17 erfolgt in der Weise, dass eine translationale Fusion zwischen den Codons für das Start Codon, den His-tag und der cDNA codierend ein Stärke phosphorylierendes Protein entsteht. Dadurch wird nach Transkription, initiiert am T7 Promotor und anschließender Translation ein Stärke phosphorylierendes Protein

20 erhalten, welches an seinem N-Terminus zusätzliche Aminosäuren, beinhaltend den His-tag, enthält.

Es sind jedoch auch andere zur Expression in Mikroorganismen geeignete Vektoren zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins verwendbar. Expressionsvektoren und dazugehörige Expressionsstämme sind dem Fachmann

25 bekannt und in geeigneter Kombination auch käuflich beim entsprechenden Fachhandel erwerbbar.

b) Herstellung von Expressionsklonen in *Escherichia coli*

Es wird zunächst ein entsprechender Transformations kompetenter *E. coli* Stamm,

30 der eine T7-RNA-Polymerase chromosomal codiert mit dem nach Schritt a) hergestellten Expressionsplasmid transformiert und anschließend auf durch Agar verfestigtem Nährmedium über Nacht bei 30°C inkubiert. Als Expressionstamm

eignen sich z.B. BL21 Stämme (Invitrogen Prod. Nr.: C6010-03 die eine T7-RNA-Polymerase unter Kontrolle eines mittels IPTG induzierbarem Promotor (lacZ) chromosomal codieren.

5 Aus der Transformation hervorgehende Bakterienkolonien können mit dem Fachmann bekannten Methoden daraufhin untersucht werden, ob sie das gewünschte Expressionsplasmid, enthaltend eine das Stärke phosphorylierende Protein codierende cDNA, enthalten. Es werden dabei Expressionsklone erhalten.

c) Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins in *Escherichia coli*

10 Zunächst wird eine Vorkultur hergestellt. Dazu wird ein Expressionsklon erhalten nach Schritt b) in 30 ml Terrific Broth (TB-Medium), enthaltend ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides beimpft und über Nacht bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert.

Anschließend wird eine Hauptkultur zur Expression eines Stärke phosphorylierenden
15 Proteins hergestellt. Dazu werden jeweils 1 Liter Erlenmeyer-Kolben, enthaltend jeweils 300 ml auf 30°C vorgewärmtes TB-Medium und ein Antibiotikum zur Selektion auf Anwesenheit des Expressionsplasmides mit jeweils 10 ml einer entsprechenden Vorkultur beimpft und bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) bis zu einer Optischen Dichte (gemessen bei einer Wellenlänge von 600 nm; OD₆₀₀) von ca.
20 0,8 inkubiert.

Wurde zur Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins ein Expressionsplasmid verwendet, bei welchem die Expression des Stärke phosphorylierenden Proteins mittels eines induzierbaren Systems initiiert wird (z.B. der Expressionsvektor pDEST™17 in BL21 *E. coli* Stämmen, induzierbar mittels
25 IPTG), so wird nach Erreichen einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 der in Hauptkultur der betreffende Induktor (z.B. IPTG) zugegeben. Nach Zugabe des Induktors wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht ist. Anschließend wird die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C)
30 vom Kulturmedium abgetrennt werden.

4. Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins

a) Aufschluss von ein Stärke phosphorylierendes Protein exprimierenden Zellen

Die nach Zentrifugation in Schritt c), Punkt 3 Allgemeine Methoden erhaltenen Zellen werden in Lysispuffer resuspendiert. Dabei werden ca. 4 ml Lysispuffer zu etwa 1 g
5 Zellen gegeben. Anschließend werden die resuspendierten Zellen für 30 Minuten auf Eis inkubiert, bevor sie mit Hilfe einer Ultraschallsonde (Baudelin Sonoplus UW 2070, Baudelin electronic, Berlin, Einstellungen: Cycle 6, 70%, 1 Minute) unter ständiger Kühlung durch Eis aufgeschlossen werden. Dabei ist darauf zu achten, dass die Zellsuspension während der Ultraschallbehandlung nicht zu stark erwärmt
10 wird. Die nach der Ultraschallbehandlung erhaltene Suspension wird zentrifugiert (12 Minuten bei 20.000xg, 4°C) und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird durch einen Filter mit 45 µm Porengröße filtriert.

b) Reinigung des Stärke phosphorylierenden Proteins

15 Handelt es sich bei dem in *E. coli* Zellen exprimierten Stärke phosphorylierenden Protein um ein Fusionsprotein mit einem His-tag, so kann eine Aufreinigung mit Hilfe von Nickelionen erfolgen, an welches das His-tag mit hoher Affinität bindet. Dazu werden 25 ml des in Schritt d) erhaltenen Filtrates mit 1 ml Ni-Agarose-Slurry (Qiagen, Prod. Nr.: 30210) versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend
20 wird das Gemisch aus Ni-Agarose-Slurry und Filtrat über eine Polystyren Säule (Pierce, Prod. Nr.: 29920) gegeben. Der Säulendurchlauf wird verworfen. Die Säule wird zunächst durch Aufgeben von 8 ml Lysispuffer gewaschen, wobei der Durchlauf erneut verworfen wird. Die Elution des Stärke phosphorylierenden Proteins erfolgt dann durch fraktioniertes Aufgeben von zweimal jeweils 1 ml E1-Puffer, gefolgt von
25 einmal 1 ml E2-Puffer und anschließend von fünfmal jeweils 1 ml E3-Puffer auf die Säule. Der Durchlauf, der bei dem Aufgeben der einzelnen Fraktion der entsprechenden Elutionspuffer (E1-, E2-, E3-Puffer) auf die Säule anfällt, wird in voneinander getrennten Fraktionen aufgefangen. Aliquots dieser Fraktionen werden anschließend mittels denaturierender SDS-Acrylamidgelelektrophorese, gefolgt von
30 einer Comassie-Blau Färbung analysiert. Die Fraktionen, welche das Stärke phosphorylierende Protein in ausreichender Menge und zufriedenstellender Reinheit enthalten, werden vereinigt und mit Hilfe von Druckfiltration bei 4°C aufkonzentriert.

Die Druckfiltration kann z.B. mit Hilfe einer Amicon-Zelle (Amicon Ultrafiltration Cell, Model 8010, Prod. Nr.: 5121) bei Verwendung einer Diaflo PM30-Membran (Millipore, Prod. Nr.: 13212) bei 4°C erfolgen. Zur Konzentrierung können aber auch andere dem Fachmann bekannte Methoden verwendet werden.

5

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

Lysispuffer: 50 mM HEPES

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

10

pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

1 mg/ml Lysozym (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

¼ Tablette pro 10 ml Proteaseinhibitoren Complete EDTA free, (Roche Produkt Nr.: 1873580) (direkt vor Verwendung des Puffers zugeben)

15 Elutionspuffer E1: 50 mM HEPES
300 mM NaCl
50 mM Imidazol
pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

20 Elutionspuffer E2: 50 mM HEPES
300 mM NaCl
75 mM Imidazol
pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

25 Elutionspuffer E3: 50 mM HEPES
300 mM NaCl
250 mM Imidazol
pH 8,0 (einstellen mit NaOH)

5. Rekombinante Expression eines R1 Proteins

Die Rekombinante Expression eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 3.

- 5 Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Rekombinante Expression eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden.

6. Reinigung eines R1 Proteins

- Die Aufreinigung eines R1 Proteins ist in der Literatur beschrieben (Ritte et al., 2002, PNAS 99, 7166-7171; Mikkelsen et al., 2004, Biochemical Journal 377, 525-532), kann jedoch auch entsprechend der weiter oben unter Punkt 4. Allgemeine Methoden beschriebenen Methode betreffend die Reinigung eines Stärke phosphorylierenden Proteins durchgeführt werden, wenn durch Expression von R1 in *E. coli* Zellen ein R1 Fusionsprotein entsteht, welches einen His-tag enthält.

15

7. In vitro Herstellung von phosphorylierter-Stärke ausgehend von nicht-phosphorylierter-Stärke

a) In vitro Phosphorylierung von nicht-phosphorylierter-Stärke

- Stärke, welche kein Stärkephosphat enthält (z.B. isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* *sex1-3* Mutanten mit Hilfe der oben unter Punkt 2, Allgemeine Methoden beschriebenen Methode) wird mit R1 Puffer und mit gereinigtem R1 Protein (ca. 0,25 µg R1 Protein pro mg Stärke) versetzt, so dass sich ein Stärkegehalt von 25 mg pro ml ergibt. Dieser Reaktionsansatz wird über Nacht (ca. 15 h) bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. An die im Reaktionsansatz vorliegende Stärke gebundenes R1 wird nach Abschluss der Reaktion durch vier maliges Waschen mit jeweils ca. 800 µl 0,5 % SDS entfernt. Anschließend wird das noch in der *in vitro* phosphorylierten Stärke vorliegende SDS durch fünf maliges Waschen mit jeweils 1 ml Waschpuffer von entfernt. Alle Waschschrte finden jeweils bei Raumtemperatur für 10 bis 15 Minuten unter Schütteln statt. Nach jedem Waschschrte erfolgt eine

Zentrifugation (2 min, 10.000xg), um die Stärkegranula vom betreffenden SDS-Puffer oder Waschpuffer abzutrennen.

b) Zusammensetzung verwendeter Puffer

5	R1-Puffer:	50 mM	HEPES/KOH, pH 7,5
		1 mM	EDTA
		6 mM	MgCl ₂
		0,5 mM	ATP

10 Waschpuffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,2

8. Bindung von Proteinen an phosphorylierte-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke

a) Isolierung von P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-

15 Protein-Komplexen

Ca. 50 mg P-Stärke, bzw. ca. 50 mg nicht-phosphorylierte Stärke werden in getrennten Ansätzen jeweils in ca. 800 µl Proteinextrakt resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Proteinextrakte sollte jeweils ca. 4 mg bis 5 mg pro ml betragen. Die Inkubation der P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierten-Stärke mit

20 Proteinextrakten wird bei Raumtemperatur für 15 Minuten unter Schütteln bei 4°C durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation werden die Reaktionsansätze über ein Percoll-Kissen (4 ml) abzentrifugiert (15 Minuten, 3500 rpm, 4°C). Nicht an phosphorylierte Stärke bzw. P-Stärke gebundene Proteine befinden sich nach Zentrifugation im Überstand und können mit einer Pasteurpipette abgenommen

25 werde. Der Überstand wird verworfen. Das nach Zentrifugation erhaltene sedimentierte Pellet enthaltend P-Stärke und nicht-phosphorylierte-Stärke inclusive der an die betreffenden Stärken jeweils gebundene Proteine (P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexe), wird zweimal mit je 1 ml Waschpuffer (siehe oben, Allgemeine Methoden unter Punkt 7.b)), durch

30 Inkubation für jeweils 3 Minuten bei 4°C unter Schütteln gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgt eine Zentrifugation (5 Minuten, 8000 rpm, 4°C in einer

Tischzentrifuge, Hettich EBA 12R), um die P-Stärke, bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von dem Waschpuffer abzutrennen.

5 b) In Lösung bringen der in den P-Stärke-Protein-Komplexen bzw. nicht-phosphorylierter-Stärke-Protein-Komplexen gebundenen Proteinen

Die nach Schritt a) erhaltenen P-Stärke-Protein-Komplexe bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke-Protein-Komplexe werden jeweils in ca. 150 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und 15 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird die P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke von den
10 in Lösung gebrachten Proteinen durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) abgetrennt. Der nach Zentrifugation erhaltene Überstand wird zur Entfernung jeglicher Reste von P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke noch einmal zentrifugiert (1 Minute, 13.000 rpm, Raumtemperatur, Eppendorf Tischzentrifuge) und abgenommen. Es werden dadurch
15 in Lösung gebrachte Proteine, die an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke binden, erhalten.

c) Zusammensetzung verwendeter Puffer

20	SDS-Probenpuffer: 187,5 mM	Tris/HCl pH 6,8
	6 %	SDS
	30 %	Glycerin
	~ 0,015 %	Bromphenolblau
	60 mM	Dithioerythritol (DTE, frisch zusetzen!)

25 Percoll: Percoll wird über Nacht gegen eine Lösung, bestehend aus und 25 mM HEPES / KOH, pH 7,0 dialysiert

9. Auftrennung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

30 Die nach Schritt c) unter Punkt 8. Allgemeine Methoden betreffend die Bindung von Proteinen an P-Stärke bzw. nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung

gebrachten Proteine werden jeweils für 5 Minuten bei 95°C inkubiert und anschließend mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Dabei wird für die durch Bindung an P-Stärke und für die durch Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke erhaltenen in Lösung gebrachten Proteine jeweils ein
5 gleiches Volumen auf das Acrylamidgel aufgetragen. Das nach erfolgter Elektrophorese erhaltene Gel wird mindestens über Nacht mit kolloidalem Comassie (Roth, Karlsruhe, Roti-Blue Rod. Nr.: A152.1) gefärbt und anschließend in 30 % Methanol, 5 % Essigsäure, oder in 25% Methanol entfärbt.

10 10. Identifizierung und Isolierung von an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke bindenden Proteinen

a) Identifizierung von Proteinen mit erhöhter Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke

Proteine, die, nach Auftrennung mittels Acrylamidgelelektrophorese und
15 anschließender Sichtbarmachung durch Färbung (siehe oben, Punkt 9. Allgemeine Methoden), ein verstärktes Signal nach Bindung an P-Stärke im Vergleich zu einem entsprechenden Signal nach Bindung an nicht-phosphorylierte-Stärke zeigen, weisen eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke auf. Dadurch können Proteine, die eine erhöhte
20 Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, identifiziert werden. Proteine, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen, werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten.

25 Identifizierung der Aminosäuresequenz von Proteinen, die eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweisen

Nach Schritt a) identifizierte Proteine werden mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptide zur Ermittlung der Massen der erhaltenen Peptide mittels MALDI-TOF
30 analysiert. Trypsin ist eine sequenzspezifische Protease, d.h. Trypsin spaltet Proteine an einer vorgegebenen Stelle nur dann, wenn die betreffenden Proteine

bestimmte Aminosäuresequenzen enthalten. Trypsin spaltet Peptidbindungen immer dann, wenn vom N-Terminus ausgehend die Aminosäuren Arginin und Lysin aufeinander folgen. Dadurch ist es möglich, sämtliche Peptide, die nach Trypsin Verdau einer Aminosäuresequenz entstehen würden, theoretisch zu ermitteln. Durch
5 die Kenntnis der die theoretisch ermittelten Peptide codierenden Aminosäuren können auch die Massen der Peptide, die nach theoretischem Trypsin Verdau erhalten werden, ermittelt werden. Datenbanken (z.B. NCBI <http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>; Swissprot <http://cbrg.inf.ethz.ch/Server/MassSearch.html>) die Informationen über die Massen
10 von Peptiden nach theoretischem Trypsin Verdau enthalten, können daher mit den real mittels MALDI-TOF-MS erhaltenen Massen von Peptiden unbekannter Proteine verglichen werden. Aminosäuresequenzen, die gleiche Peptidmassen nach theoretischem und/oder realem Trypsin Verdau aufweisen, sind als identisch anzusehen. Die betreffenden Datenbanken enthalten sowohl Peptidmassen von

15 Proteinen, deren Funktion bereits nachgewiesen wurde, als auch Peptidmassen von Proteinen, welche bisher nur hypothetisch durch Ableitung von Aminosäuresequenzen ausgehend von in Sequenzierprojekten erhaltenen Nucleinsäuresequenzen existieren. Die tatsächliche Existenz und die Funktion solcher hypothetischen Proteine ist daher selten nachgewiesen und wenn überhaupt
20 eine Funktion angegeben ist, dann beruht diese meist alleinig auf Vorhersagen, jedoch nicht auf einem tatsächlichen Nachweis der Funktion.

Banden, enthaltend nach Schritt a) identifizierte Proteine werden aus dem Acrylamidgel ausgeschnitten; das ausgeschnittene Acrylamidstück wird zerkleinert und durch Inkubation für ca. eine halbe Stunde bei 37°C in ca. 1 ml 60% 50mM
25 NH_4HCO_3 , 40% Acetonitril entfärbt. Anschließend wird die Entfärbelösung abgenommen und das verbleibende Gel unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach Trocknung wird Trypsinlösung zum Verdau des in dem betreffenden Gelstück enthaltenen Proteins hinzu gegeben. Der Verdau erfolgt über Nacht bei 37°C. Nach dem Verdau wird wenig (bis das Acrylamidgel sich weißlich färbt) Acetonitril
30 zugegeben und der Ansatz unter Vakuum (z.B. Speedvac) getrocknet. Nach erfolgter Trocknung wird so viel 5%ige Ameisensäure zugegeben, dass die getrockneten Bestandteile gerade bedeckt sind und für einige Minuten bei 37°C inkubiert. Die

Behandlung mit Acetonitril gefolgt von der Trocknung wird einmal wiederholt. Anschließend werden die getrockneten Bestandteile in 0,1% TFA (Trifluoressigsäure, 5 µl bis 10 µl) aufgenommen und in ca. 0,5 µl Portionen auf einen Träger aufgetropft. Auf den Träger werden ebenfalls gleiche Mengen Matrix (ϵ -Cyano-4-hydroxymethylsäure) aufgegeben. Nach Auskristallisieren der Matrix werden die Massen der Peptide mittels MALDI-TOF-MS-MS (z.B. Burker ReflexTM II, Bruker Daltonic, Bremen) ermittelt. Mit den erhaltenen Massen werden Datenbanken auf Aminosäuresequenzen hin durchsucht, welche nach theoretischem Trypsinverdau gleiche Massen ergeben. Somit können Aminosäuresequenzen identifiziert werden, welche Proteine codieren, die bevorzugt an phosphorylierte alpha-1,4-Glucane binden und/oder P-alpha-1,4-Glucane als Substrat benötigen.

11. Verfahren zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins

- a) Inkubation von Proteinen mit P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierter-Stärke
- Um nachzuweisen, ob ein Protein eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit Stärke und radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden ca. 5 mg P-Stärke bzw. ca. 5 mg nicht-phosphorylierte-Stärke mit dem zu untersuchenden Protein (0,01 µg bis 5,0 µg pro mg eingesetzter Stärke) in 500 µl Phosphorylierungspuffer für 10 Minuten bis 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Zugabe von SDS bis zu einer Konzentration von 2% (Gewicht/Volumen) gestoppt. Die im jeweiligen Reaktionsgemisch vorliegenden Stärkegranula werden abzentrifugiert (1 Minute, 13.000xg), einmal mit 900 µl einer 2 % SDS Lösung und jeweils viermal mit 900 µl einer 2 mM ATP Lösung gewaschen. Jeder Waschschrift wird für 15 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln durchgeführt. Nach jedem Waschschrift werden die Stärkegranula durch Zentrifugation (1 Minute, 13.000xg) vom betreffenden Waschpuffer abgetrennt. Zusätzlich sollten bei der Durchführung eines Experimentes zum Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität eines Proteins weitere Reaktionsansätze, die kein Protein oder inaktiviertes Protein enthalten, ansonsten aber in gleicher Weise

wie die beschriebenen Reaktionsansätze behandelt werden, als so genannte Kontrollen mitgeführt werden.

- b) Ermittlung der Menge an durch enzymatische Aktivität in die P-Stärke und/oder
5 nicht-phosphorylierte-Stärke eingebauten Phosphatreste

Die nach Schritt a) erhaltenen Stärkegranula können auf des Vorliegen von
radioaktiv markierten Phosphatresten hin untersucht werden. Dazu wird die jeweilige
Stärke in je 100 µl Wasser resuspendiert und mit jeweils 3 ml Scintillationscocktail
(z.B. Ready Safe™, BECKMANN Coulter) versetzt und anschließend mit Hilfe eines
10 Scintillationszählers (z.B. LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN
COULTER™) analysiert.

- c) Identifizierung von Proteinen, die bevorzugt P-Stärke als Substart verwenden
Wird ein Protein in getrennten Ansätzen einmal mit P-Stärke und einmal mit nicht-
15 phosphorylierter-Stärke nach der unter a) beschriebenen Methode inkubiert, so kann
durch Vergleich der nach Schritt b) erhaltenen Werte für das Vorliegen von
Stärkephosphat ermittelt werden, ob das betreffende Protein mehr Phosphat in P-
Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke eingebaut hat. Damit können
auch Proteine identifiziert werden, die Phosphat in P-Stärke, nicht jedoch in nicht-
20 phosphorylierte-Stärke einführen können. D.h. es können Proteine identifiziert
werden, die bereits phosphorylierte Stärke als Substart für eine weitere
Phosphorylierungsreaktion benötigen.

- d) Zusammensetzung verwendeter Puffer

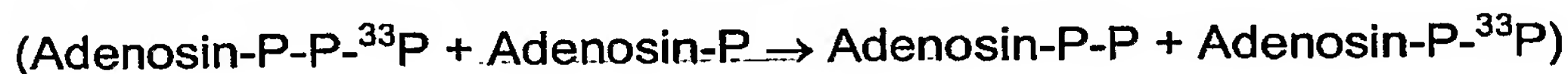
25 Phosphorylierungs-Puffer: 50 mM HEPES/KOH, pH 7,5
1 mM EDTA
6 mM MgCl₂
0,01 bis 0,5 mM ATP
30 0,2 bis 2 µCi pro ml randomisiertes ³³P-ATP (alternativ
kann auch ATP eingesetzt werden, welches einen
spezifisch in beta-Position markierten Phosphatrest
enthält)

Unter dem Begriff „randomisiertes ATP“ soll im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ATP verstanden werden, welches sowohl in gamma-Position, als auch in beta-Position markierte Phosphatreste enthält (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171). Randomisiertes ATP wird in der wissenschaftlichen Literatur auch als Beta/gamma-ATP bezeichnet. Eine Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP ist im Folgenden beschrieben.

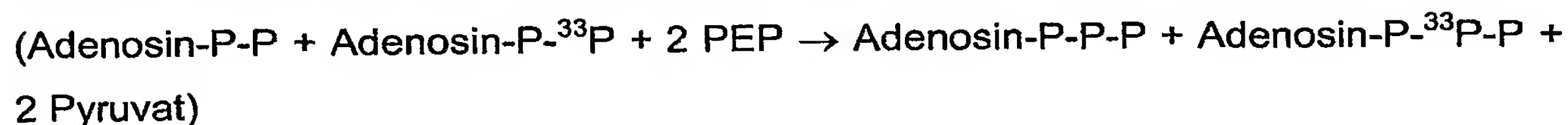
i) Herstellung von randomisiertem ATP

Der hier beschriebenen Methode zur Herstellung von randomisiertem ATP mit Hilfe von Enzym katalysierten Reaktionen liegen folgende Reaktionsmechanismen zu Grunde:

1. Reaktionsschritt:



2. Reaktionsschritt:



Die Reaktionsgleichgewichte liegen auf Produktseite, trotzdem entsteht bei dieser Reaktion eine Mischung aus größtenteils $\beta^{33}\text{P-ATP}$ und etwas $\gamma^{33}\text{P-ATP}$.

ii) Durchführung des 1. Reaktionsschrittes

ATP (100 μCi , 3000 Ci pro mmol), welches einen in gamma-Position mit ^{33}P markierten Phosphatrest enthält (Hartmann Analytic, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$), wird mit 2 μl Myokinase (AMP-phosphotransferase, aus Kaninchen Muskel; SIGMA, Prod. Nr.: M3003 3,8 mg/ml, 1,626 Units/mg) in 90 μl Randomisierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion durch Inkubation für 12 Minuten bei 95°C gestoppt, bevor der Reaktionsansatz mittels Zentrifugalfiltration über einen Microcon YM 10 Filter (Amicon, Millipore Prod. Nr. 42407) bei 14.000xg für mindestens 10 Minuten aufgereinigt wird.

iii) Durchführung des 2. Reaktionsschrittes

Dem in Schritt ii) erhaltenen Filtrat werden 2 µl Pyruvatkinase (zur Herstellung einer entsprechenden Lösung siehe unten) und 3 µl 50 mM PEP (Phosphoenolpyruvat) zugegeben. Dieses Reaktionsgemisch wird für 45 Minuten bei 30°C inkubiert, bevor die Reaktion durch Inkubation bei 95°C für 12 Minuten gestoppt wird. Anschließend wird das Reaktionsgemisch zentrifugiert (2 Minuten, 12.000 rpm in einer Eppendorftischzentrifuge). Der nach Zentrifugation erhaltene, randomisierte ATP enthaltende Überstand wird abgenommen, aliquotiert und kann bei -20°C gelagert werden.

10 Herstellung der Pyruvatkinase Lösung

15 µl Pyruvatkinase (aus Kaninchenmuskel, Roche, Prod. Nr. 12815), 10 mg/ml, 200 Units/mg bei 25 °C) werden abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 27 µl Pyruvatkinasepuffer aufgenommen.

iv) Verwendete Puffer

15	Pyruvatkinasepuffer:	50 mM	HEPES/KOH pH 7,5
		1 mM	EDTA
20	Randomisierungspuffer:	100 mM	HEPES/KOH pH 7,5
		1 mM	EDTA
		10 %	Glycerol
		5 mM	MgCl ₂
		5 mM	KCl
		0,1 mM	ATP
		0,3 mM	AMP

25

12. Nachweis der Autophosphorylierung eines Proteins

Um nachzuweisen, ob ein Protein eine autophosphorylierende Aktivität aufweist, können zu untersuchende Proteine mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Dazu werden zu untersuchende Proteine (50 µg bis 100 µg) in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) für 30 Minuten bis 90 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend

30

wird die Reaktion durch Zugabe von EDTA bis zu einer Endkonzentration von 0,11 M gestoppt. Ca. 2 µg bis 4 µg Protein werden mit Hilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Das nach Polyacrylamidgelelektrophorese erhaltene Gel wird einer Autoradiographie unterzogen. Proteine, die in der Autoradiographie ein Signal zeigen, tragen einen radioaktiven Phosphatrest.

10 **13. Identifizierung der C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans, in welche Phosphatreste durch ein Stärke phosphorylierendes Protein eingeführt werden**

Welche C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans von einem Protein phosphoryliert werden, kann durch Hydrolyse der durch ein betreffendes Protein *in vitro* phosphorylierten erhaltenen Glucane, anschließender Auftrennung der nach Hydrolyse erhaltenen Glucosemonomere, gefolgt von Messung des durch ein betreffendes Protein eingebautes Phosphat in bestimmte Fraktionen der Glucosemoleküle geführt nachgewiesen werden.

a) Totalhydrolyse der alpha-1,4-Glucane

20 Alpha-1,4-Glucan enthaltende Wasser-Suspensionen werden zentrifugiert, das sedimentierte Pellet anschließend in 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und unter Schütteln für 2 Stunden bei 95°C inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Proben kurz abgekühlt und zentrifugiert (z.B. 2 Minuten 10.000xg). Der erhaltene Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 2 M NaOH (Baker, zur Analyse) neutralisiert. Falls ein Pellet zurück bleibt, wird es in 100 µl Wasser resuspendiert und die Menge des darin vorliegenden markierten Phosphates zur Kontrolle bestimmt.

Der neutralisierte Überstand wird anschließend über einen 10 kDa Filter zentrifugiert. Durch Messung eines Aliquots des erhaltenen Filtrates wird die Menge an markiertem Phosphat im Filtrat z.B. mit Hilfe eines Scintillationszählers bestimmt.

b) Fraktionierung der Hydrolyseprodukte und Ermittlung der phosphorylierten C-Atom Positionen

Die mittels Schritt a) erhaltenen neutralisierten Filtrate der Hydrolyseprodukte können (bei Verwendung von radioaktiv markiertem ATP etwa 3.000 cpm) mit Hilfe von z.B.

- 5 Hoch-Druck-Anionenaustausch-Chromatographie (HPAE) aufgetrennt werden. Zur Einstellung des für die HPAE benötigten Volumens kann das neutralisierte Filtrat mit H₂O verdünnt werden. Weiterhin wird den entsprechenden Filtraten als interne Kontrolle jeweils Glucose-6-Phosphat (ca. 0,15 mM) und Glucose-3-Phosphat (ca. 0,3 mM) zugegeben. Die Auftrennung mittels HPAE kann z.B. mit Hilfe einer Dionex
- 10 Anlage DX 600 Bio Lc unter Verwendung einer CarboPac PA 100 Säule (mit entsprechender Vorsäule) und eines gepulsten amperometrischen Detektors (ED 50) Detektors erfolgen. Dabei wird vor Injektion der Probe die Säule zunächst für 10 Minuten mit 99% Eluent C und 1% Eluent D gespült. Anschließend werden jeweils 60 µl Probenvolumen injiziert. Die Elution der Probe erfolgt durch folgende

15 Bedingungen:

Flußrate: 1 ml pro Minute

Gradient: linear ansteigend von 0 Minuten bis 30 Minuten

		Eluent C	Eluent D
	0 Minuten	99%	1%
20	30 Minuten	0%	100%
	35 Minuten	0%	100%
	Stop des Laufes		

- Die von der Säule eluierten Hydrolyseprodukte werden in einzelnen Fraktionen von
- 25 je 1 ml aufgefangen. Da den injizierten Proben der Hydrolyseprodukte jeweils nicht markiertes Glucose-3-Phosphat (Ritte et al. 2002, PNAS 99, 7166-7171) und nicht markiertes Glucose-6-Phosphat (Sigma, Prod. Nr.: G7879) als interne Standards zugemischt wurden, können mittels gepulster amperometrischer Detektion die Fraktionen ermittelt werden, welche entweder Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-
- 30 Phosphat enthalten. Durch Messung der Menge an markierten Phosphaten in den einzelnen Fraktionen und anschließendem Vergleich mit den Fraktionen, welche Glucose-3-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat enthalten, können damit diejenigen

Fraktionen ermittelt werden, in welchen markiertes Glucose-6-Phosphat oder markiertes Glucose-3-Phosphat enthalten ist. Die Menge des markierten Phosphates in den betreffenden Fraktion wird bestimmt. Durch die Verhältnisse der für markiertes Phosphat gemessenen Mengen an Glucose-3-Phosphat zu Glucose-6-Phosphat in den einzelnen Hydrolyseprodukten, kann nun ermittelt werden, welche C-Atom-Position von einem alpha-1,4-Glucan phosphorylierenden Enzym bevorzugt phosphoryliert wird.

c) Verwendete Puffer

- 10 Eluent C: 100 mM NaOH
Eluent D: 100 mM NaOH
500 mM Natriumacetat

14. Transformation von Reispflanzen

- 15 Reispflanzen wurden nach der von Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

15. Transformation von Kartoffelpflanzen

- Kartoffelpflanzen wurden mit Hilfe von Agrobakterium, wie bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29) beschrieben, transferiert.

16. Transformation von Weizenpflanzen

Weizenpflanzen wurden nach der bei Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert.

25

17. Transformation von Maispflanzen

Unreife Embryonen von Maispflanzen der Linie A188 wurden nach der bei Ishida et al. (1996, Nature Biotechnology 14, 745-750) beschriebenen Methode transformiert.

18. Bestimmung des Gehaltes an Stärkephosphat

a) Bestimmung des C-6-Phosphatgehaltes

In der Stärke können die Positionen C2, C3 und C6 der Glukoseeinheiten phosphoryliert sein. Zur Bestimmung des C6-P-Gehaltes der Stärke werden 50 mg Stärke in 500 µl 0,7 M HCl 4 h bei 95°C hydrolysiert. Anschließend werden die Ansätze für 10 min bei 15500 g zentrifugiert und die Überstände abgenommen. Von den Überständen werden 7µl mit 193 µl Imidazol-Puffer (100 mM Imidazol, pH 7,4; 5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA und 0,4 mM NAD) gemischt. Die Messung wurde im Photometer bei 340 nm durchgeführt. Nach der Etablierung einer Basisabsorption wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe von 2 Einheiten (units) Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (von Leuconostoc mesenteroides, Boehringer Mannheim) gestartet. Die Absorptionsänderung ist direkt proportional zur Konzentration des G-6-P Gehaltes der Stärke.

15 b) Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtphosphatgehaltes erfolgte nach der Methode von Ames (Methods in Enzymology VIII, (1966), 115-118).

Es werden ca. 50 mg Stärke mit 30 µl ethanolischer Magnesiumnitrat-Lösung versetzt und drei Stunden bei 500°C im Muffelofen verascht. Der Rückstand wird mit 20 300 µl 0,5 M Salzsäure versetzt und 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot auf 300 µl 0,5 M Salzsäure aufgefüllt, zu einer Mischung aus 100 µl 10%iger Ascorbinsäure und 600 µl 0,42% Ammoniummolybdat in 2 M Schwefelsäure gegeben und 20 min bei 45°C inkubiert.

25 c) Bestimmung des Gehaltes an C-6-Phosphat und C-3-Phosphat

Zur Bestimmung des Gehaltes an Phosphat, welcher in C-6-Position und in C-3-Position der Glucosemoleküle eines alpha-1,4-Glucans gebunden ist, können die betreffenden Glucane nach Totalhydrolyse nach der unter Allgemeine Methoden 13 angeführten Methode mittels HPAE aufgetrennt werden. Die Mengen an Glucose-6-30 Phosphat und Glucose-3-Phosphat können durch Integration der einzelnen, nach HPEA Aufrennung erhaltenen Peakflächen ermittelt werden. Durch Vergleich der

erhaltenen Peakflächen für Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in unbekannten Proben, mit den Peakflächen, die nach Auftrennung mittels HPEA mit bekannten Mengen an Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat erhalten werden, kann die Menge von Glucose-6-Phosphat und Glucose-3-Phosphat in den
5 zu untersuchenden Proben bestimmt werden.

Beispiele

- 10 1. Isolierung eines Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, welches eine erhöhte Bindungsaktivität gegenüber P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke aufweist
- a) Herstellung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana*
Proteinextrakte wurden aus etwa 7 g Blättern (Frischgewicht) von *Arabidopsis*
15 *thaliana* (Ökotyp Columbia, Col-O) nach dem unter Punkt 1, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren hergestellt.
- b) Isolierung von Stärkegranula aus Blättern von *sex1-3* Mutanten von *Arabidopsis thaliana*
20 Stärkegranula wurden aus etwa 20 g (Frischgewicht) aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach dem unter Punkt 2., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren isoliert.
- c) *In vitro* Phosphorylierung von Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von
25 *Arabidopsis thaliana* mit gereinigtem R1 Protein
Etwa 30 mg nicht-phosphorylierte-Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* wurde nach dem unter Punkt 7., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren mittels eines rekombinant in *E. coli* exprimierten und gereinigten R1 Proteins phosphoryliert. Zur Expression des R1 Proteins in *E. coli* und
30 zur anschließenden Aufreinigung wurden die bei Ritte et al. (2002, PNAS 99, 7166-7171) beschriebenen Verfahren verwendet.

- d) Isolierung von Proteinen, die an P-Stärke und/oder nicht-phosphorylierte-Stärke binden

Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) wurden in einem
5 Ansatz A mit 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

- 10 In einem zweiten Ansatz B wurden Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana*, erhalten nach Schritt a) mit 50 mg der nach Schritt b) hergestellten nicht-phosphorylierten-Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen.

Anschließend wurden die an P-Stärke des Ansatzes A und die an nicht-phosphorylierte-Stärke des Ansatzes B nach dem unter Punkt 8 b), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren in Lösung gebracht.

- 15 In einem dritten Ansatz C wurden 50 mg der nach Schritt c) hergestellten *in vitro* phosphorylierten Stärke nach dem unter Punkt 8 a), Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren inkubiert und gewaschen. Ansatz C enthielt jedoch keinen Proteinextrakt.

- 20 e) Auftrennung der nach Schritt d) erhaltenen Proteine mittels Acrylamidgelelektrophorese

- Die in Schritt d) erhaltenen Proteine der Ansätze A, B und C wurden mittels einem 9%igem Acrylamidgel unter denaturierenden Bedingungen (SDS) nach dem unter Punkt 9., Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren aufgetrennt und
25 anschließend mit Comassie Blau gefärbt. Das gefärbte Gel ist in Fig. 1 dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass ein Protein, welches im denaturierenden Acrylamidgel bezogen auf eine Proteinstandardmarker (Spur M) ein Molekulargewicht von ca. 130 kDa aufweist, bevorzugt an phosphorylierte Stärke Spur P) im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke (K) bindet.

30

- f) Identifizierung des Proteins, das bevorzugt an P-Stärke im Vergleich zu nicht-phosphorylierter-Stärke bindet

Die in Schritt e) identifizierte Bande des Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kDa wurde aus dem Gel ausgeschnitten. Anschließend wurde das Protein wie unter Allgemeine Methoden 10 b) beschrieben, aus dem Acrylamid herausgelöst, mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidmassen mittels MALD-TOF-MS bestimmt.

- 5 Der durch MALDI-TOF-MS erhaltene so genannte „Fingerprint“ wurde mit in Datenbanken (Mascot: http://www.matrixscience.com/search_form_select.html; ProFound: http://129.85.19.192/profound_bin/WebProFound.exe; PepSea: <http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html>) enthaltenen Fingerprints theoretisch verdauter Aminosäuremoleküle verglichen. Da ein solcher Fingerprint sehr spezifisch
- 10 für ein Protein ist, konnte ein Aminosäuremolekül identifiziert werden. Mit Hilfe der Sequenz dieses Aminosäuremoleküls konnte eine ein OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz aus *Arabidopsis thaliana* isoliert werden. Das mit diesem Verfahren identifizierte Protein wurde mit A.t.-OK1 bezeichnet. Nach Analyse der Aminosäuresequenz des OK1 Proteins aus *Arabidopsis thaliana*, ergab sich, dass
- 15 diese von der in der Datenbank vorliegenden Sequenz (NP 198009, NCBI) abweicht. Die in SEQ ID No 2 dargestellte Aminosäuresequenz codiert das A.t.-OK1 Protein. SEQ ID No 2 enthält im Vergleich mit der Sequenz der Datenbank (Acc.: NP 198009.1, NCBI) Abweichungen. Die in SEQ ID No 2 enthaltenen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE) und 762 bis 766 (VRARQ) sind nicht in der Sequenz, welche in der
- 20 Datenbank vorliegt (ACC.: NP 198009.1) enthalten. Gegenüber der Version 2 der Datenbanksequenz (Acc.: NP 198009.2) enthält die in SEQ ID NO 2 dargestellte Aminosäuresequenz noch die zusätzlichen Aminosäuren 519 bis 523 (WRLCE).

2. Klonierung einer cDNA, die das identifizierte OK1 Protein codiert

- Die A.t.-OK1 cDNA wurde mit Hilfe reverser PCR unter Verwendung von mRNA,
- 25 isoliert aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* isoliert. Dazu wurde ein cDNA Strang mittels reverser Transkriptase SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT PCR, Invitrogen Prod. Nr.: 11904-018) synthetisiert, welcher dann unter Verwendung von DNA Polymerase amplifiziert (Expand High Fidelity PCR Systems, Roche Prod. Nr.: 1732641) wurde. Das erhaltene Amplifikat dieser PCR Reaktion wurde in den
- 30 Vektor pGEM®-T (Invitrogen Prod. Nr.: A3600) kloniert. Das erhaltene Plasmid wird

mit A.t.-OK1-pGEM bezeichnet, die das A.t.-OK1 Protein codierende cDNA Sequenz wurde ermittelt und ist unter SEQ ID NO. 1 dargestellt.

Die unter SEQ ID NO 1 dargestellte Sequenz entspricht nicht der Sequenz, die in der Datenbank enthalten ist. Diese wurde oben bereits für die Aminosäuresequenz,
5 codierend ein A.t.-OK1 Protein diskutiert.

Verwendete Bedingungen für die Amplifikation der cDNA codierend das A.t.-OK1 Proteins

Erststrangsynthese:

Es wurden die vom Hersteller angegebenen Bedingungen und Puffer verwendet. Der
10 Reaktionsansatz für die Erststrangsynthese enthielt außerdem folgende Substanzen:

3 µg Gesamt-RNA

5 µM 3'-Primer (OK1rev1: 5'-GACTCAACCACATAACACACAAAGATC)

0,83 µM dNTP Mix

Der Reaktionsansatz wurde für 5 Minuten bei 75°C inkubiert und anschließend auf
15 Raumtemperatur abgekühlt.

Anschließend wurden 1st Strand buffer, RNase Inhibitor und DTT zugegeben und für 2 Minuten bei 42°C inkubiert, bevor 1 µL Superscript RT DNA Polymerase zugegeben wurde und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert wurde.

Bedingungen Für die Amplifikation des Erststranges mittels PCR:

20 1 µL des Reaktionsansatzes der Erststrangsynthese

0.25 µM 3'Primer (OK1rev2: 5'- TGGTAACGAGGCAAATGCAGA)

0.25 µM 5'Primer (OK1fwd2: 5'- ATCTCTTATCACACCACCTCCAATG)

Reaktionsbedingungen:

Schritt 1 95°C 2 min

25 Schritt 2 94°C 20 sec

Schritt 3 62°C 30 sec (Temp. pro Zyklus -0.67°C) (30 s), 68°C (

Schritt 4 68°C 4 Minuten

Schritt 5 94°C 20 sec

Schritt 6 56°C 30 sec

30 Schritt 7 68°C 4 Minuten

Schritt 8 68°C 10 Minuten

Zunächst wurde die Reaktion nach den Schritten 1 bis 4 durchgeführt. Zwischen Schritt 4 und Schritt 2 folgten 10 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Temperatur des Schrittes 3 nach jedem Zyklus um 0,67°C verringert wurde. Anschließend erfolgte die Reaktion nach den in Schritten 5 bis 8 angegebenen Bedingungen.

- 5 Zwischen Schritt 7 und Schritt 5 folgten 25 Wiederholungen (Zyklen), wobei die Zeit des Schrittes 7 je Zyklus um 5 sec verlängert wurde. Nach erfolgter Reaktion wurde die Reaktion auf 4°C gekühlt.

3. Herstellung eines Vektors, zur rekombinanten Expression der cDNA des OK1 Proteins

- 10 Die Sequenz codierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach Amplifikation mittels PCR durch Verwendung des Plasmides A.t.-OK1-pGEM als Template unter Verwendung der Gateway Technologie (Invitrogen) zunächst in den Vektor pDONORTM 201 (Invitrogen Prod. Nr.: 11798-014) kloniert. Anschließend wurde die codierende Region des OK1 Proteins aus dem erhaltenen Vektor durch
- 15 sequenzspezifische Rekombination in den Expressionsvektor pDEST17TM (Invitrogen Prod. Nr.: 11803-014) kloniert. Der erhaltene Expressionsvektor wird mit A.t.-OK1-pDESTTM17 bezeichnet. Durch die Klonierung entstand eine translationale Fusion der das A.t.-OK1 Protein codierenden cDNA mit in dem Expressionssvektor pDESTTM17 vorliegenden Nucleotiden. Die aus dem Vektor pDESTTM17 stammenden Nucleotide,
- 20 die mit der cDNA codierend das A.t.-OK1 Protein translational fusioniert sind, codieren 21 Aminosäuren. Diese 21 Aminosäuren umfassen u.a. das Start Codon (ATG) und einen so genannten His-tag (6 Histidinreste direkt hintereinander). Nach Translation dieser translational fusionierten Sequenzen entsteht dadurch ein A.t.-OK1 Protein, welches an seinem N-terminus die zusätzlichen 21 Aminosäuren,
- 25 codiert durch Nucleotide, stammend aus dem Vektor aufweist. Das aus diesem Vektor resultierende rekombinante A.t.-OK1-Protein enthält daher 21, aus dem Vektor pDESTTM17 stammende, zusätzliche Aminosäuren an seinem N-Terminus.

4. Heterologe Expression des OK1 Proteins in *E. coli*

Der nach Beispiel 3 erhaltene Expressionsvektorektor A.t.-OK1-pDEST™17 wurde in den *E. coli* Stamm BL21 Star™ (DE3) (Invitrogen, Prod. Nr. C6010-03) transformiert. Eine Beschreibung dieses Expressionssystems ist bereits weiter oben (siehe Punkt 3.,
5 Allgemeine Methoden) erfolgt. Aus der Transformation resultierende Bakterienklone, enthaltend den Vektor A.t.-OK1-pDEST™17, dienten zunächst zur Herstellung einer Vorkultur, die anschließend zur Beimpfung einer Hauptkultur verwendet wurde (siehe Punkt 3.c), Allgemeine Methoden). Vorkultur und Hauptkultur wurden jeweils bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert. Nachdem die Hauptkultur eine OD₆₀₀ von
10 ca. 0,8 erreicht hatte wurde die Expression des rekombinanten A.t.-OK1 Proteins durch Zugabe von IPTG (Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert. Nach Zugabe von IPTG wird die Hauptkultur bei 30°C unter Schütteln (250 rpm) inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von ca. 1,8 erreicht war. Anschließend wurde die Hauptkultur für 30 Minuten auf Eis gekühlt, bevor die Zellen
15 der Hauptkultur durch Zentrifugation (10 Minuten bei 4.000xg und 4°C) vom Kulturmedium abgetrennt wurden.

5. Reinigung des rekombinant exprimierten OK1 Proteins

Die Reinigung und Aufkonzentration des A.t.-OK1 Proteins aus Zellen, erhalten nach
20 Beispiel 4, wurde nach dem unter Punkt 4, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren durchgeführt.

6. Nachweis von Stärke phosphorylierender Aktivität des OK1 Proteins

Der Nachweis der Stärke phosphorylierenden Aktivität des A.t.-OK1 Proteins erfolgte
25 nach dem unter Punkt 11, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren. Dabei wurden jeweils 5 µg von nach Beispiel 5 hergestelltem, gereinigtem A.t.-OK1 Protein, in einem Ansatz A mit 5 mg Stärke, isoliert aus einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* nach Beispiel 1 b) und in einem Ansatz B mit 5 mg Stärke, erhalten durch enzymatische Phosphorylierung nach Beispiel 1 c) in jeweils 500 µl
30 Phosphorylierungspuffer enthaltend 0,05 mM radioaktiv (³³P) markiertes,

randomisiertes ATP (insgesamt 1.130.00 cpm, ca. 0,55 μ Ci) für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz C, welcher dem Ansatz B entsprach, jedoch kein OK1 Protein enthielt, ansonsten aber in gleicher Weise behandelt wurde, wie die Ansätze A und B. Für alle Ansätze (A, B, C)

5 wurden jeweils zwei voneinander unabhängige Versuche durchgeführt.

Mittels Verwendung eines Scintillationszählers wurden die Stärken aus den Ansätzen A, B, und C auf das Vorliegen von radioaktiv markiertem Phosphat hin untersucht (siehe Punkt 11 b), Allgemeine Methoden). Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 und in Fig. 3 dargestellt.

10

	Gemessene Radioaktivität [cpm]	
	Versuch 1	Versuch 2
Ansatz A (nicht-phosphorylierte Stärke + OK1)	42	47
Ansatz B (phosphorylierte Stärke + OK1)	7921	8226
Ansatz C (phosphorylierte Stärke ohne Protein)	56	53

Tabelle 1: Nachweis einer Stärke phosphorylierenden Aktivität des Ok1 Proteins

Aus den erhaltenen Ergebnissen ist erkennbar, dass das OK1 Protein keine Phosphatgruppen von ATP auf Stärke überträgt, wenn nicht-phosphorylierte-Stärke als Substrat angeboten wird, da der in cpm gemessene Anteil der durch ein OK1 Protein auf nicht-phosphorylierte-Stärke übertragenen Phosphatgruppen den Anteil der radioaktiv markierten Phosphatgruppen in Ansatz C (Kontrolle) nicht übersteigt. Wird hingegen P-Stärke als Substrat angeboten, ist der in cpm gemessene Anteil an radioaktiven Phosphatgruppen, welcher von ATP auf P-Stärke übertragen wird, 15
20
signifikant höher. Daraus ist ersichtlich, dass das OK1 Protein P-Stärke als Substrat benötigt und dass nicht-phosphorylierte-Stärke nicht als Substrat von dem OK1 Protein akzeptiert wird.

Wird der oben dargestellte Versuch mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP durchgeführt, so kann kein Einbau von radioaktiv markiertem Phosphat in die Stärke festgestellt werden. Daraus ergibt sich, dass der beta-Phosphatrest des ATP von einem OK1 Protein auf Stärke übertragen wird. Die
5 Ergebnisse eines solchen Versuches sind in Fig. 6 dargestellt.

7. Nachweis der Autophosphorylierung

Der Nachweis der Autophosphorylierung des A.t.-OK1 Proteins erfolgte mittels der weiter oben beschriebenen Methode (siehe Punkt 12, Allgemeine Methoden). Dabei
10 wurden 50 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mit radioaktiv markiertem, randomisiertem ATP in 220 µl Phosphorylierungspuffer (siehe oben, Punkt 12 d), Allgemeine Methoden) bei Raumtemperatur für 60 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden den Inkubationsansätzen jeweils 100 µl entnommen und in vier
frische Reaktionsgefäße überführt. In Reaktionsgefäß 1 wurde die Reaktion durch
15 Zugabe von je 40 µl 0,11M EDTA gestoppt. Reaktionsgefäß 2 wurde bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Zu Reaktionsgefäß 3 wurde HCl bis zu einer Endkonzentration von 0,5 M zugegeben und zu Reaktionsgefäß 4 wurde NaOH bis zu einer
Endkonzentration von 0,5 M zugegeben. Die Reaktionsgefäße 3 und 4 wurden
jeweils für 25 Minuten bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden jeweils 50 µl der
20 Reaktionsgefäße 1, 2, 3 und 4 entnommen, mit SDS Probenpuffer versetzt und mittels SDS-Acrylamidgelelektrophorese (7,5%iges Acrylamidgel) aufgetrennt. Dazu wurden Proben der Reaktionsgefäße auf jeweils zwei identische Acrylamidgele aufgetragen. Eines der nach erfolgter Elektrophorese erhaltenen Gele wurde einer
Autoradiographie unterzogen, während das zweite Gel mit Comassie Blau gefärbt
25 wurde.

In dem mit Comassie Blau gefärbten Gel (siehe Fig. 2A)) ist deutlich zu erkennen, dass die Behandlung mit 0,5 M NaOH zu einem Abbau des OK1 Proteins führt. Das OK1 Protein ist daher als labil gegenüber NaOH zu bezeichnen. Inkubation bei 30°C, 95°C und mit 0,5 M HCl zeigen, dass das OK1 Protein unter den genannten
30 Inkubationsbedingungen relativ stabil ist. Dieses ist daraus zu schließen, dass bei

diesen Inkubationsbedingungen jeweils etwa gleiche Mengen OK1 Protein nach Comassie Blau Färbung im betreffenden Gel nachgewiesen werden können.

- In der Autoradiographie (siehe Abb. 2B)) ist durch Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu erkennen, dass eine Inkubation des phosphorylierten OK1 Proteins bei 95°C zu einer deutlichen Reduzierung des Phosphates, welches an das OK1 Protein gebunden ist, führt. Die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins ist daher als Hitzelabil zu bezeichnen. Weiterhin ist eine leichte Abnahme des an das OK1 Protein gebundenen Phosphates ebenfalls bei Inkubation mit 0,5 M HCl und 0,5 M NaOH im Vergleich mit bei 30°C inkubiertem phosphoryliertem OK1 Protein zu beobachten. Wird die Tatsache berücksichtigt, dass die Menge des OK1 Proteins in der Autoradiographie nach Behandlung mit 0,5 M NaOH wegen der Labilität des OK1 Proteins gegenüber NaOH wesentlich geringer ist, als in den mit Hitze und Säure behandelten Proben, so kann geschlossen werden, dass die Bindung zwischen dem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins relativ stabil gegenüber Basen ist. Da die mit Säure behandelte Probe etwa gleiche Proteinmengen wie die bei 30°C und bei 95°C inkubierte Probe enthält, jedoch ein signifikant geringeres Signal als die mit 30°C behandelte Probe in der Autoradiographie aufweist, ist davon auszugehen, dass auch saure Inkubationsbedingungen die Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins zu einem gewissen Maße spalten. Daher konnte in den durchgeführten Versuchen auch eine Labilität der Bindung zwischen einem Phosphatrest und einer Aminosäure des OK1 Proteins festgestellt werden. Die Labilität gegenüber Säuren ist dabei jedoch wesentlich weniger ausgeprägt als die Labilität gegenüber Hitze. Bindungen zwischen der Aminosäure Histidin und Phosphat sind Hitzelabil, Säurelabil aber Basestabil (Rosenberg, 1996, Protein Analysis and Purification, Birkhäuser, Boston, 242-244). Die oben beschriebenen Ergebnisse sind daher ein Hinweis darauf, dass durch Autophosphorylierung eines OK1 Proteins ein Phosphohistidin entsteht.
- Wird rekombinant exprimiertes OK1 Protein wie oben beschrieben mit spezifisch in gamma-Position mit ^{33}P markiertem ATP inkubiert, so kann keine Autophosphorylierung festgestellt werden. Fig. 5 A) zeigt die Menge an Protein, die

nach den betreffenden Inkubationsschritten mittels Western Blot Analyse in dem jeweiligen Reaktionsansatz noch nachgewiesen werden kann. Fig. 5 B) zeigt eine Autoradiographie von Protein aus den einzelnen Reaktionsansätzen. Es ist zu erkennen, dass bei Verwendung von spezifisch in der gamma-Position markiertem ATP keine Autophosphorylierung des OK1 Proteins auftritt, während bei Verwendung von randomisiertem ATP eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden kann. Dieses bedeutet, dass bei der Autophosphorylierung eines OK1 Proteins der Phosphatrest der beta-Position des ATP kovalent an eine Aminosäure des OK1 Proteins gebunden wird.

10

8. Nachweis der von einem OK 1 Protein phosphorylierten C-Atom-Positionen der Glucosemoleküle von Stärke

a) Herstellung von phosphorylierter-Stärke

Phosphorylierte Stärke wurde nach Punkt 7, Allgemeine Methoden hergestellt. Es wurden dazu in einem Ansatz A 5 mg nicht phosphorylierte Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* mit 25 µg gereinigtem A.t.-OK1 Protein und in einem zweiten Ansatz B 5 mg *in vitro* phosphorylierter-Stärke ursprünglich isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana*) mit 5 µg gereinigtem R1 Protein eingesetzt. Die Reaktion erfolgte jeweils in 500 µl Phosphorylierungspuffer, der jeweils ³³P markiertes ATP (ca. 2,5 x 10⁶ cpm) enthielt, durch Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde unter Schütteln. Zusätzlich wurde ein Kontrollansatz, welcher 5 mg Stärke, isoliert aus Blättern einer *sex1-3* Mutante von *Arabidopsis thaliana* und den genannten Phosphorylierungspuffer, jedoch kein Protein enthielt, verwendet. Der Kontrollansatz wurde genauso behandelt, wie die Ansätze A und B. Die einzelnen Reaktionen wurden durch Zugabe von jeweils 125 µl 10% SDS gestoppt und mit je 900 µl einmal mit 2% SDS, fünfmal mit 2 mM ATP und zweimal mit H₂O gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte eine Zentrifugation (jeweils 2 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm). Die erhaltenen Stärkepellets wurden jeweils in 1 ml H₂O resuspendiert und 100 µl jedes Ansatzes wurden nach Zugabe von 3 ml Scintillationscocktail (Ready SafeTM,

BECKMANN) versetzt und anschließend mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen.

Die Messung ergab folgende Ergebnisse:

	Kontrolle:	63 cpm/100 µL	630 cpm/1000 µl
5	Ansatz A (OK1):	1351 cpm/100 µl	13512 cpm/1000 µl
	Ansatz B (R1):	3853 cpm/100 µl	38526 cpm/1000 µl

b) Totalhydrolyse der P-Stärke

Die nach Schritt a) erhaltenen Suspensionen der Ansätze A, B und C wurden erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), die erhaltenen Pellets in 90 µl 0,7 M HCl (Baker, zur Analyse) resuspendiert und anschließend für 2 Stunde bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze A, B und C erneut zentrifugiert (5 Minuten in einer Eppendorf Tischzentrifuge bei 13.000 rpm), und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Sedimentierte

Rückstände der Ansätze wurden in jeweils 100 µl H₂O resuspendiert und nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTER™) vermessen. In keinem der Rückstände konnten signifikante Mengen an Radioaktivität nachgewiesen werden, was bedeutet, dass sich alle mit radioaktivem

Phosphat markierten Hydrolyseprodukte im Überstand befinden.

Danach erfolgte die Neutralisation der einzelnen Überstände, enthaltend die Hydrolyseprodukte, durch Zugabe von jeweils 30 µl 2 M NaOH (die Menge der zur Neutralisation benötigten Menge von NaOH wurde vorher an Blindproben ausgetestet): Die neutralisierten Hydrolyseprodukte wurden auf einen 10 kDa Microcon-Filter, der vorher zweimal mit je 200 µl H₂O gespült wurde, gegeben und für ca. 25 Minuten bei 12.000 rpm in einer Eppendorf Tischzentrifuge zentrifugiert. Von dem erhaltenen Filtrat (jeweils ca. 120 µl) wurden je 10 µl abgenommen, die nach Zugabe von je 3 ml Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter, BECKMANN COULTERTM) vermessen wurden. Die Bestimmung der in den einzelnen Ansätzen vorliegenden Aktivität ergab dabei folgende Ergebnisse:

Ansatz A (OK1):	934 cpm/10 µl	11.208 cpm/120 µl	93 cpm/µl
-----------------	---------------	-------------------	-----------

Ansatz B (R1):	2518 cpm/10 µl	30.216 cpm/120 µl	252 cpm/µl
----------------	----------------	-------------------	------------

c) Auftrennung der Hydrolyseprodukte

Die Auftrennung der nach Schritt b) erhaltenen Hydrolyseprodukte wurde mittels
5 HPAE unter Verwendung einer Dionex Anlage unter den oben angegebenen
Bedingungen (siehe (Allgemeine Methoden Punkt 13 c)) durchgeführt.. Die Proben
zur Auftrennung der filtrierten Überstände der Ansätze A und B, erhalten nach Schritt
b) waren dazu wie folgt zusammengesetzt:

Ansatz A (OK1): 43 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes A
10 (entspricht ca. 4.000 cpm), 32 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl
5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

Ansatz B (R1): 16 µl des nach Schritt b) erhaltenen Überstand des Ansatzes B
(entspricht ca. 4.000 cpm), 59 µl H₂O, 2,5 µl 2,5 mM Glucose-6-Phosphat und 2,5 µl
5 mM Glucose-3-Phosphat (Σ Volumen = 80 µl).

15 Jeweils 60 µl, enthaltend ca. 3.000 cpm, der entsprechenden Proben wurden zur
Auftrennung mittels HPAE injiziert. Die Durchführung der HPAE erfolgte nach den
unter Punkt 23 c) angegebenen Bedingungen. Die Elutionspuffer wurden nach
Passage der HPAE-Säule in Fraktionen von je 1 ml aufgesammelt. Das Aufsammeln
der Fraktionen wurde 10 Minuten nach Injektion der Probe begonnen. Anhand des
20 erhaltenen Signals des eingesetzten PAD Detektors konnte die Elution von Glucose-
6-Phosphat der Fraktion 15 und die die Elution von Glucose-3-Phosphat der Fraktion
17 zugeordnet werden. Jeweils 500 µl der einzelnen Fraktionen wurden mit je 3 ml
Scintillationscocktail (Ready Safe™, BECKMANN) gemischt und anschließend mit
Hilfe eines Scintillationszählers (LS 6500 Multi-Purpose Scintillation Counter,
25 BECKMANN COULTERTM) vermessen. Für die einzelnen Fraktionen wurden
folgende Meßwerte erhalten:

	Gesamt cpm je Fraktion	
	Ansatz (OK1)	AAAnsatz (R1)
Fr 13	8,7	3,3
Fr 14	13,1	32,2
Fr 15 (G6P)	207,3	1952,8
Fr 16	399,8	112,3
Fr 17 (G3P)	1749,2	801,6
Fr 18	196,7	17,3
Fr 19	6,7	18,9
Summe	2581,5	2938,3
Auftrag	3000,0	3000,0
Wiederfindung	86,0%	97,9%

Tabelle 4: Gemessene Menge an Radiaktivität [cpm] in einzelnen Fraktionen von Hydrolyseprodukten, erhalten durch Hydrolyse von mittels eines OK1 Proteins oder R1 Proteins phosphorylierten Stärke.

Die Ergebnisse sind auch in Fig. 5 graphisch dargestellt

5

Nach von R1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 66% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt und ca. 27% mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt. Nach von OK1 Protein katalysierter Phosphorylierung von Stärke, eluierten nach Hydrolyse der Stärke ca. 67% des radioaktiv markierten Phosphates, bezogen auf das gesamte gemessene radioaktive Phosphat in den analysierten Fraktionen, mit der Fraktion, die Glucose-3-Phosphat als Standard enthielt und ca. 8% mit der Fraktion, die Glucose-6-Phosphat als Standard enthielt.. Daraus kann geschlossen werden, dass Glucosemoleküle der Stärke von R1 Proteinen bevorzugt in C-6-Position phosphoryliert werden, während von OK1 Proteinen Glucosemoleküle der Stärke bevorzugt in C-3-Position phosphoryliert werden.

10

15

9. Identifizierung eines OK1 Proteins in Reis

Durch Verwendung der unter den Punkten 1 bis 13, Allgemeine Methoden beschriebenen Verfahren konnte auch ein Protein aus *Oryza sativa* (Varietät M202) identifiziert werden, welches einen Phosphatrest von ATP auf P-Stärke überträgt.

- 5 Das Protein wurde mit O.s.-OK1 bezeichnet. Nicht-phosphorylierte-Stärke wird von dem O.s.-OK1 Protein nicht als Substrat verwendet, d.h. auch das O.s.-OK1 Protein benötigt P-Stärke als Substrat. Die das identifizierte O.s.-OK1 Protein codierende Nucleinsäuresequenz ist unter SEQ ID NO 3 und die das O.s.-OK1 Protein codierende Aminosäuresequenz ist unter SEQ ID NO. 4 dargestellt. Die unter SEQ
10 ID NO 4 dargestellte Aminosäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 57% mit der unter SEQ ID NO 2 dargestellten Aminosäuresequenz codierend das A.t.-OK1 Protein auf. Die unter SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleinsäuresequenz codierend das O.s.-OK1 Protein weist eine Identität von 61% mit der unter SEQ-ID-NO-1-dargestellten Nucleinsäuresequenz, codierend-das-A.t.-
15 OK1 Protein auf.

Herstellung des Plasmides pMI50 enthaltend die Nucleinsäuresequenz codierend ein OK1 Protein aus *Oryza sativa*

- Der Vektor pMI50 enthält ein DNA-Fragment welches das vollständige OK1 Protein
20 aus Reis der Varietät M202 kodiert.

Die Amplifikation der DNA aus Reis erfolgte in fünf Teilschritten.

- Der Teil des offenen Leserasters von Position -11 bis Position 288 der unter SEQ
DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide
25 Os_ok1-R9 (GGAACCGATAATGCCTACATGCTC) und Os_ok1-F6
(AAACTCGAGGAGGATCAATGACGTCGCTGCGGCCCTC) als Primer auf RNA von
unreifen Reissamen amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den
Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene
Plasmid wurde mit pML123 bezeichnet.

- 30 Der Teil des offenen Leserasters von Position 250 bis Position 949 der unter SEQ
DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide

Os_ok1-F4 (CCAGGTTAAGTTTGGTGAGCA) und Os_ok1-R6
(CAAAGCACGATATCTGACCTGT) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML120
5 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 839 bis Position 1761 der unter SEQ
DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide
Os_ok1-F7 (TTGTTCGCGGGATATTGTCAGA) und Os_ok1-R7
10 (GACAAGGGCATCAAGAGTAGTATC) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML121
bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 1571 bis Position 3241 der unter SEQ
15 DIE NO 3 angegebenen Sequenz wurde mit Hilfe von Reverser Transkriptase und der
Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide
Os_ok1-F8 (ATGATGCGCCTGATAATGCT) und Os_ok1-R4
(GGCAAACAGTATGAAGCACGA) als Primer auf RNA von unreifen Reissamen
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen
20 Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit
pML119 bezeichnet.

Der Teil des offenen Leserasters von Position 2777 bis Position 3621 wurde mit Hilfe
der Polymerase Kettenreaktion unter Verwendung der synthetischen Oligonukleotide
Os_ok1-F3 (CATTTGGATCAATGGAGGATG) und Os_ok1-R2
25 (CTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) als Primer auf genomischer DNA von Reis
amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen
Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML122
bezeichnet.

Die Zusammenklonierung der Teilstücke des offenen Leserasters von OK1 erfolgte
30 folgendermaßen.

Ein 700 Basenpaare langes *Apal*-Fragment aus pML120, einen Teil des offenen Leserasters von OK1 enthaltend wurde in die *Apal*-Schnittstelle von pML121 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

Ein 960 Basenpaare langes Fragment enthaltend die für OK1 codierenden Bereiche
5 der Vektoren aus pML120 und pML123 wurde mittels Polymerase Kettenreaktion amplifiziert. Dabei wurden die Primer Os_ok1-F4 (s. o.) und Os_ok1-R9 (s. o.) je in einer Konzentration von 50 nm und die Primer Os_ok1-F6 und Os_ok1-R6 je in einer Konzentration von 500 nm eingesetzt. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene
10 Plasmid wurde mit pMI44 bezeichnet.

Ein 845 Basenpaare langes Fragment aus pML122 wurde zur Einführung einer *XhoI*-Schnittstelle nach dem Stop-Codon mit den Primern Os_ok1-F3 (s. o.) und Os_ok1-R2Xho (AAAACTCGAGCTATGGCTGTGGCCTGCTTTGCA) reamplifiziert und in den Vektor pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert. Das erhaltene
15 Plasmid wurde mit t pMI45 bezeichnet.

Ein 1671 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde aus pML119 durch Verdau mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *PstI* erhalten. Das Fragment wurde in pBluskript II SK+ (Genbank Acc.: X52328) kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI46 bezeichnet.

20 Ein 1706 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *SpeI* und *XhoI* aus pMI46 herausgeschnitten und in den Vektor pMI45 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI47 bezeichnet.

25 Ein 146 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *AflII*/*NotI* aus pMI43 herausgeschnitten und in den Vektor pMI44 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pMI49 bezeichnet.

Ein 1657 Basenpaare langes Fragment enthaltend einen Teil des offenen
30 Leserasters von OK1 wurde mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *NarI* aus dem Vektor pMI49 herausgeschnitten und in den Vektor pMI47 kloniert, der mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten worden war. Das erhaltene Plasmid wurde mit

pMI50 bezeichnet und enthält die gesamte codierende Region des in Reis identifizierten OK1 Proteins.

10. Herstellung eines Antikörpers, der ein OK1 Protein spezifisch erkennt

- 5 Als Antigen wurde ca. 100 µg gereinigtes A.t.-OK1 Protein mittels SDS Gelelektrophorese aufgetrennt, die Proteinbande enthaltend das A.t.-OK1 Protein ausgeschnitten und an die Firma EUROGENTEC S.A. (Belgien) verschickt, die die Herstellung des Antikörpers im Auftrag ausführte. Zunächst wurden die Preimmunseren von Kaninchen dahingehend geprüft, ob sie evtl. bereits vor der
- 10 Immunisierung mit rekombinantem OK1 ein Protein aus einem A. t. Gesamtextrakt erkennen. Die Preimmunseren zweier Kaninchen erkannten im Bereich 100-150 kDa keine Proteine und wurden daraufhin für die Immunisierung ausgewählt. Pro Kaninchen wurden 4 Injektionen à 100 µg Protein durchgeführt (Tag 0, 14, 28, 56). Je Kaninchen wurden 4 Blutentnahmen durchgeführt: (Tag 38, Tag 66, Tag 87 und
- 15 die Endblutung). Serum, erhalten nach der ersten Blutung zeigte bereits eine spezifische Reaktion mit OK1 Antigen im Western-Blot. Für alle weiteren Versuche wurde jedoch die letzte Blutung eines Kaninchens verwendet.

11. Herstellung transgener Reispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

a) Herstellung des Plasmides pGlo-A.t.-OK1

Das Plasmid pIR94 wurde erhalten indem der Promoter des Globulin-Gens aus Reis durch eine Polymerase Kettenreaktion (30 x 20 sec 94 °C, 20 sec 62 °C, 1 min 68 °C, 4 mM Mg₂SO₄) mit den Primern glb1-F2 und glb1-R1 (AAAACAATTGGCGCCTGGAGGGAGGAGA) und (AAAACAATTGATGATCAATCAGACAATCACTAGAA) auf genomischer DNA von Reis der Varietät M202 mit High Fidelity Taq Polymerase (Invitrogen, Katalognummer 11304-011) amplifiziert und in pCR2.1 (Invitrogen Katalognummer K2020-20) kloniert wurde.

Das Plasmid pIR115 wurde erhalten indem eine synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonukleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) und X2

5 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde.

Das erhaltene Plasmid pIR115 wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels
10 T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

Das Plasmid pIR103 wurde erhalten, indem ein 986 Basenpaare langes DNA
15 Fragment aus pIR94, enthaltend den Promoter des Globulin-Gens aus Reis, kloniert in das Plasmid pIR96 kloniert wurde.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),
20 19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al., Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des *Pseudomonas*-
25 Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen *aadA*, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

30 Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären *bar*-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre *bar*-Gen enthält die

Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das *bar*-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das *bar*-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein DNA-Fragment, welches die Sequenz des vollständigen offenen Leserasters des OK1 Proteins aus *Arabidopsis* enthält, wurde aus dem Vektor A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in den Vektor pLR103 kloniert. Dazu wurde das Plasmid A.t.-OK1-pGEM mit dem Restriktionsenzymen *Bsp120I* geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sall* nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in den mit *Ecl136II* und *XhoI* geschnittenen Vektor pLR103 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pGlo-A.t.-OK1 bezeichnet.

15

b) Transformation von Reispflanzen

Reispflanzen (Varietät M202) wurden mittels *Agrobacterium* (enthaltend das Plasmid pGlo-A.t.-OK1) unter Verwendung der bei Hiei et al. (1994, Plant Journal 6(2), 271-282) beschriebenen Methode transformiert.

20

c) Analyse der transgenen Reispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke
Es konnten mittels Quantitativer RT PCR Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA codierend das A.t.-OK1 Protein aufwiesen.

Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Körner dieser Pflanzen wurden geerntet. Stärke, isoliert aus diesen reifen Körnern, zeigten einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphat im Vergleich zu Stärke, isoliert aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

30

12. Herstellung transgener Kartoffelpflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

a) Herstellung des Plasmides pBinB33-Hyg

Ausgehend vom Plasmid pBinB33 wurde das *EcoRI*-*HindIII*-Fragment umfassend
5 den B33-Promotor, einen Teil des Polylinkers sowie den *ocs*-Terminator
herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBIB-Hyg ligiert
(Becker, 1990, Nucl. Acids Res. 18, 203).

Das Plasmid pBinB33 wurde erhalten, indem der Promotor des Patatin Gens B33
aus *Solanum tuberosum* (Rocha-Sosa et al., 1989) als *DraI*-Fragment (Nucleotide –
10 1512 - +14) in den mit *SstI* geschnittenen Vektor pUC19, dessen Enden mit Hilfe der
T4 DNA-Polymerase geglättet worden waren, ligiert wurde. Daraus entstand das
Plasmid pUC19-B33. Aus diesem Plasmid wurde der B33-Promotor mit *EcoRI* und
SmaI herausgeschnitten und in den entsprechend geschnittenen Vektor pBinAR
(Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230) ligiert. Hieraus entstand
15 der pflanzliche Expressionsvektor pBinB33.

b) Herstellung des Vektors A.t.-OK1-pBinB33-Hyg

Die codierende Sequenz des A.t.-OK1 Proteins wurde mit den
Restriktionsendonucleasen *Bsp120I* und *Sall* aus dem Plasmid A.t.-OK1-pGEM
20 herausgeschnitten und in den mit *SmaI* und *Sall* geschnittenen Vektor pBinB33-Hyg
ligiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit A.t.-OK1-pBinB33-Hyg bezeichnet.

c) Transformation von Kartoffelpflanzen

Agrobacterium tumefaciens (Stamm GV2260) wurde mit dem Plasmid A.t.-OK1-
25 pBinB33-Hyg transformiert. Anschließend wurden Kartoffelpflanzen der Varietät
Désirée mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens*, enthaltend das Plasmid A.t.-OK1-
pBinB33-Hyg nach der bei Rocha-Sosa et al. (EMBO J. 8, (1989), 23-29)
beschriebenen Methode transformiert und Pflanzen regeneriert.

30 d) Analyse der transgenen Kartoffelpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Es konnten mittels Northern Blot Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein aufwiesen.

Eine Western Blot Analyse, welche mit dem unter Beispiel 10 beschriebenen Antikörpers durchgeführt wurde, bestätigte, dass Pflanzen, bei welchen mRNA des heterolog exprimierten OK1 Proteins nachzuweisen war, auch eine erhöhte Menge an OK1 Protein aufwiesen, im Vergleich zu nicht transformierten Wildtyp-Pflanzen. Pflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine erhöhte Menge an OK1 Protein und eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Stärke, die aus Knollen dieser Pflanzen isoliert wurde, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke gebundenem Phosphat.

13. Herstellung transgener Maispflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

15 a) Herstellung des Plasmides pUbi-A.t.-OK1

Zunächst wurde das Plasmid pIR96 hergestellt. Das Plasmid pIR96 wurde erhalten, indem ein synthetisches Stück DNA bestehend aus den beiden Oligonucleotiden X1 (TGCAGGCTGCAGAGCTCCTAGGCTCGAGTTAACACTAGTAAGCTTAATTAAGAT ATCATTAC) und X2 (AATTGTAAATGATATCTTAATTAAGCTTACTAGTGTTAACTCGAGCCTAGGAGCT CTGCAGCCTGCA) in den mit *SdaI* und *MunI* geschnittenen Vektor pGSV71 kloniert wurde. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten und die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet. Das erhaltene Plasmid wurde mit *SdaI* geschnitten, die überstehenden 3'-Enden mit T4 DNA Polymerase geglättet und ein 197 Basenpaare großes, mittels T4 DNA-Polymerase geglättetes *HindIII* / *SphI* Fragment aus pBinAR (Höfgen und Willmitzer, 1990, Plant Science 66, 221-230), enthaltend das Terminationssignal des Octopinsynthese Gens aus *Agrobacterium tumefaciens*, eingefügt. Das erhaltene Plasmid wurde mit pIR96 bezeichnet.

pGSV71 ist ein Derivat des Plasmides pGSV7, welches sich vom intermediären Vektor pGSV1 ableitet. pGSV1 stellt ein Derivat von pGSC1700 dar, dessen Konstruktion von Cornelissen und Vanderwiele (Nucleic Acid Research 17, (1989),

19-25) beschrieben wurde. pGSV1 wurde aus pGSC1700 erhalten, durch Deletion des Carbenicillin Resistenzgen, sowie Deletion der T-DNA-Sequenzen der TL-DNA-Region des Plasmides pTiB6S3.

pGSV7 enthält den Replikationsursprung des Plasmides pBR322 (Bolivar et al.,
5 Gene 2, (1977), 95-113) sowie den Replikationsursprung des Pseudomonas-Plasmides pVS1 (Itoh et al., Plasmid 11, (1984), 206). pGSV7 enthält außerdem das selektierbare Markergen aadA, aus dem Transposon Tn1331 aus *Klebsiella pneumoniae*, welches Resistenz gegenüber den Antibiotika Spectinomycin und Streptomycin verleiht (Tolmasky, Plasmid 24 (3), (1990), 218-226; Tolmasky and
10 Crosa, Plasmid 29(1), (1993), 31-40)

Das Plasmid pGSV71 wurde erhalten durch Klonierung eines chimären bar-Gens zwischen die Borderregionen von pGSV7. Das chimäre bar-Gen enthält die Promotorsequenz des Blumenkohlmosaikvirus zur Initiation der Transkription (Odell et al., Nature 313, (1985), 180), das bar-Gen aus *Streptomyces hygroscopicus*
15 (Thompson et al., Embo J. 6, (1987), 2519-2523) und den 3'-untranslatierten Bereich des Nopalinsynthasegens der T-DNA von pTiT37, zur Termination der Transkription und Polyadenylierung. Das bar-Gen vermittelt Toleranz gegenüber dem Herbizid Glufosinat-Ammonium.

Ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-
20 Gens aus Mais (EMBL Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant Mol. Biol. 18: 675-689) wurde als *Pst*I-Fragment in pBluescript II SK+ kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq bezeichnet.

Das Plasmid A.t.-OK1-pGEM wurde mit dem Restriktionsenzymen *Bsp*120I geschnitten, mit T4-DNA-Polymerase die Enden geglättet und mit *Sac*I
25 nachgeschnitten. Das DNA-Fragment kodierend das OK1 Protein aus *Arabidopsis thaliana* wurde in das Plasmid pSK-ubq kloniert, welches mit *Sma*I und *Sac*I geschnitten war. Das erhaltene Plasmid wurde mit pSK-ubq-ok1 bezeichnet.

Aus dem Plasmid pSK-ubq-ok1 wurde ein Fragment isoliert, welches den Ubiquitin-Promoter aus Mais und das vollständige offene Leseraster für das A.t.-OK1 Protein
30 aus *Arabidopsis thaliana* enthielt. Dazu wurde das Plasmid mit dem Restriktionsenzym *Asp*718I geschnitten, die Enden mit T4 DNA Polymerase aufgefüllt und mit *Sda*I nachgeschnitten. Das erhaltene, 5799 Basenpaare große

Fragment wurde in das mit *EcoRV* und *PstI* geschnittene Plasmid pIR96 kloniert. Das aus dieser Klonierung erhaltene Plasmid wurde mit pUbi-A.t.-OK1 bezeichnet.

b) Transformation von Maispflanzen

5 Maispflanzen wurden mit dem Plasmid pUbi-A.t.-OK1 mittels der unter Allgemeine Methoden, Punkt 17 beschriebenen Methode transformiert.

c) Analyse der transgenen Maispflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke
Es konnten mittels Northern Blot Analyse Pflanzen identifiziert werden, die eine
10 Expression von mRNA, codierend das A.t.-OK1 Protein aufwiesen.
Maispflanzen, die im Vergleich zu entsprechenden Wildtyp-Pflanzen eine nachweisbare Menge an A.t.-OK1 Protein codierender mRNA aufwiesen, wurden im Gewächshaus angezogen. Körner dieser Pflanzen wurden geerntet. Stärke, isoliert aus den Körnern, zeigte einen erhöhten Gehalt an kovalent an die betreffende Stärke
15 gebundenem Phosphat im Vergleich zu Stärke, isoliert aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen.

14. Herstellung transgener Weizenpflanzen, die eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen

20 a) Herstellung eines Plasmides zur Transformation von Weizenpflanzen
pMCS5 (Mobitec, www.mobitec.de) wurde mit *BglII* und *BamHI* verdaut und religiert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4 bezeichnet.
Der *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* (Depicker et al., 1982, Journal of Molecular and Applied Genetics 1: 561-573) wurde mit den Primern P9
25 (ACTTCTgCAgCggCCgCgATCgTTCAAACATTTggCAATAAAgTTTC) und P10 (TCTAAgCTTggCgCCgCTAgCAgATCTgATCTAgTAACATAgATgACACC)
amplifiziert (25 Zyklen, 30 sec 94 °C, 30 sec 58 °C, 30 sec 72 °C), mit *HindIII* und *PstI* verdaut und in das mit den gleichen Enzymen geschnittene Plasmid pML4 kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML4-nos bezeichnet. In diesen Vektor
30 wurde ein 1986 Basenpaare langes Fragment enthaltend den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais (Genbank Acc.: 94464, Christensen et al., 1992, Plant

Mol. Biol. 18: 675-689) und das durch Verdau mit *Clal* und Religation verkürzte erste Intron desselben Gens kloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit pML8 bezeichnet. In das Plasmid pML8 wurde das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* kloniert. Dazu wurde das entsprechende Fragment mit
5 *Bsp120/NotI* aus A.t.-OK1-pGEM herausgeschnitten und in sense Orientierung in die *NotI*-Schnittstelle von pML8 ligiert.

Aus dem erhaltenen Vektor pML8-A.t.-OK1 kann mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* ein Fragment für die Transformation von Weizenpflanzen herausgeschnitten werden, welches den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais,
10 das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält.

b) Transformation von Weizenpflanzen

Weizenpflanzen der Varietät Florida wurden mit einem aus einem Agarosegel
15 gereinigten Fragment, welches mit den Restriktionsenzymen *AvrII* und *SwaI* aus dem Plasmid pML8-A.t.-OK1 herausgeschnitten wurde und den Promoter des Polyubiquitin-Gens aus Mais, das vollständige offene Leseraster von OK1 aus *Arabidopsis thaliana* und den *nos*-Terminator aus *Agrobacterium tumefaciens* enthält, und dem Plasmid pGSV71 mittels der biolistischen Methode nach der bei
20 Becker et al. (1994, Plant Journal 5, 299-307) beschriebenen Methode transformiert.

c) Analyse der Analyse der transgenen Weizenpflanzen und der von diesen synthetisierten Stärke

Aus, reifen Körnern der aus der Transformation erhaltenen T0 Pflanzen wurde Stärke
25 isoliert und der Gehalt an kovalent an die Stärke gebundenem Phosphat bestimmt. Der Phosphatgehalt der Stärke, die aus einzelnen Körnern isoliert wurde, war deutlich höher, als bei Stärke, die aus Körnern von entsprechenden Wildtyp-Pflanzen isoliert wurde.

Patentansprüche

1. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine erhöhte Aktivität mindestens eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen aufweist.
2. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 1, wobei die genetische Modifikation in der Einführung mindestens eines fremden Nucleinsäuremoleküls in das Genom der Pflanze besteht.
3. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 2, wobei das fremde Nucleinsäuremolekül ein OK1 Protein codiert.
4. Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine modifizierte Stärke synthetisiert.
5. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 4, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen erhöhten Gehalt an Stärkephosphat und/oder eine veränderte Phosphatverteilung aufweist.
6. Genetisch modifizierte Pflanzenzelle nach Anspruch 5, wobei die modifizierte Stärke dadurch gekennzeichnet ist, dass sie ein verändertes Verhältnis von C-3-Phosphat zu C-6-Phosphat aufweist.
7. Pflanze enthaltend genetisch modifizierte Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
8. Pflanze nach Anspruch 7, die eine Stärke speichernde Pflanze ist.
9. Pflanze nach Anspruch 8, die eine Maispflanze oder Weizenpflanze ist.
10. Vermehrungsmaterial von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.
11. Erntebare Pflanzenteile von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 enthaltend Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6.

12. Verfahren zur Herstellung einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, worin
 - a) eine Pflanzenzelle genetisch modifiziert wird, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der (enzymatischen) Aktivität eines OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen führt;
 - b) aus Pflanzenzellen von Schritt a) eine Pflanze regeneriert wird; und
 - c) gegebenenfalls weitere Pflanzen mit Hilfe der Pflanzen nach Schritt b) erzeugt werden.
13. Modifizierte Stärke erhältlich aus einer genetisch modifizierten Pflanze nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
- ~~14. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanzenzelle nach einem der Ansprüche 1 bis 6.~~
15. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus einer Pflanze nach einem der Ansprüche 7, 8, oder 9.
16. Verfahren zur Herstellung einer modifizierten Stärke umfassend den Schritt der Extraktion der Stärke aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
17. Verfahren zur Herstellung einer derivatisierten Stärke, worin modifizierte Stärke nach Anspruch 13 oder erhältlich durch ein Verfahren nach einem der Ansprüche 14, 15 oder 16 derivatisiert wird.
18. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 zur Herstellung einer modifizierten Stärke.
19. Derivatisierte Stärke erhältlich nach einem Verfahren nach Anspruch 17.
20. Verwendung von modifizierter Stärke nach Anspruch 13 oder erhältlich nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 14, 15 oder 16 zur Herstellung von derivatisierter Stärke.

21. Mehle, enthaltend modifizierte Stärke nach Anspruch 13.
22. Mehle, erhältlich aus Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6, aus Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10 oder aus erntebaren Pflanzenteilen nach Anspruch 11.
23. Verfahren zur Herstellung von Mehlen, umfassend den Schritt des Mahlens von Teilen von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 oder von Vermehrungsmaterial nach Anspruch 10 oder erntebarem Material nach Anspruch 11.
24. Verwendung von genetisch modifizierten Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 1 bis 6 oder von Pflanzen nach einem der Ansprüche 7, 8 oder 9 zur Herstellung von Mehlen.
25. Nucleinsäuremolekül codierend ein Protein mit der enzymatischen Aktivität eines ~~OK1~~ Proteins, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus
 - a) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein mit der unter SEQ ID NO. 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz codieren;
 - b) Nucleinsäuremolekülen, die ein Protein codieren, dessen Aminosäuresequenz eine Identität von mindestens 60% zu der unter SEQ ID NO: 2 oder SEQ ID NO 4 angegebenen Aminosäuresequenz aufweist;
 - c) Nucleinsäuremolekülen, die die unter SEQ ID No. 1 oder SEQ ID NO 3 dargestellte Nucleotidsequenz oder eine zu diesen Sequenzen komplementäre Sequenz umfassen;
 - d) Nucleinsäuremolekülen, welche zu den unter a) oder c) beschriebenen Nucleinsäuresequenzen eine Identität von mindestens 60% aufweisen;
 - e) Nucleinsäuremolekülen, welche mit mindestens einem Strang der unter a), oder c) beschriebenen Nucleinsäuremolekülen unter stringenten Bedingungen hybridisieren;
 - f) Nucleinsäuremolekülen, deren Nucleotidsequenz aufgrund der Degeneration des genetischen Codes von der Sequenz der unter a) oder c) genannten Nucleinsäuremoleküle abweicht; und

- g) Nucleinsäuremolekülen, die Fragmente, allelische Varianten und/oder Derivate der unter a), b), c), d), e) oder f) genannten Nucleinsäuremolekülen darstellen.
26. Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass es ein OK1 Protein aus *Arabidopsis* oder ein OK1 Protein aus Reis codiert.
27. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 25 oder 26.
28. Vektor enthaltend ein Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 25, 26 oder 27.
29. Vektor nach Anspruch 28, wobei das Nucleinsäuremolekül mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Transkription in prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen initiieren.
-
30. Wirtszelle, die genetisch modifiziert ist mit einem Nucleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 25 oder 26, einem rekombinanten Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 27 oder mit einem Vektor nach einem der Ansprüche 28 oder 29.
31. Zusammensetzung enthaltend Nucleinsäuremoleküle nach einem der Ansprüche 25 oder 26, ein rekombinantes Nucleinsäuremolekül nach Anspruch 27 oder einen Vektor nach einem der Ansprüche 28 oder 29.
32. Verwendung einer Zusammensetzung nach Anspruch 31 zur Identifizierung von Pflanzenzellen, die im Vergleich zu nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen eine erhöhte Aktivität eines OK1 Proteins aufweisen.
33. Protein, welches eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweist und phosphorylierte Stärke als Substrat benötigt.
34. Protein, welches phosphorylierte-Stärke als Substrat benötigt und einen Phosphatrest von ATP auf phosphorylierte-Stärke überträgt.

0 5 -08- 2334

Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Pflanzenzellen und Pflanzen, die genetisch modifiziert sind, wobei die genetische Modifikation zur Erhöhung der Aktivität eines Stärke phosphorylierenden OK1 Proteins im Vergleich zu entsprechenden nicht genetisch modifizierten Wildtyp-Pflanzenzellen bzw. Wildtyp-Pflanzen führt. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung Mittel und Verfahren zur Herstellung solcher Pflanzenzellen und Pflanzen. Derartige Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisieren eine modifizierte Stärke. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die von den erfindungsgemäßen Pflanzenzellen und Pflanzen synthetisierte Stärke, Verfahren zur Herstellung dieser Stärke, sowie die Herstellung von Stärkederivaten dieser modifizierten Stärke, als auch Mehle, enthaltend erfindungsgemäße Stärken.

Weiterhin betrifft die vorliegende Erfindung Nucleinsäuren, codierend Stärke phosphorylierende OK1 Proteine, sowie Vektoren, Wirtszellen, Pflanzenzellen und Pflanzen enthaltend solche Nucleinsäuremoleküle. Ferner betrifft die vorliegende Erfindung OK1 Proteine, die eine Stärke phosphorylierende Aktivität aufweisen.

EPC-BERLIN
05-03-2004

1 / 5

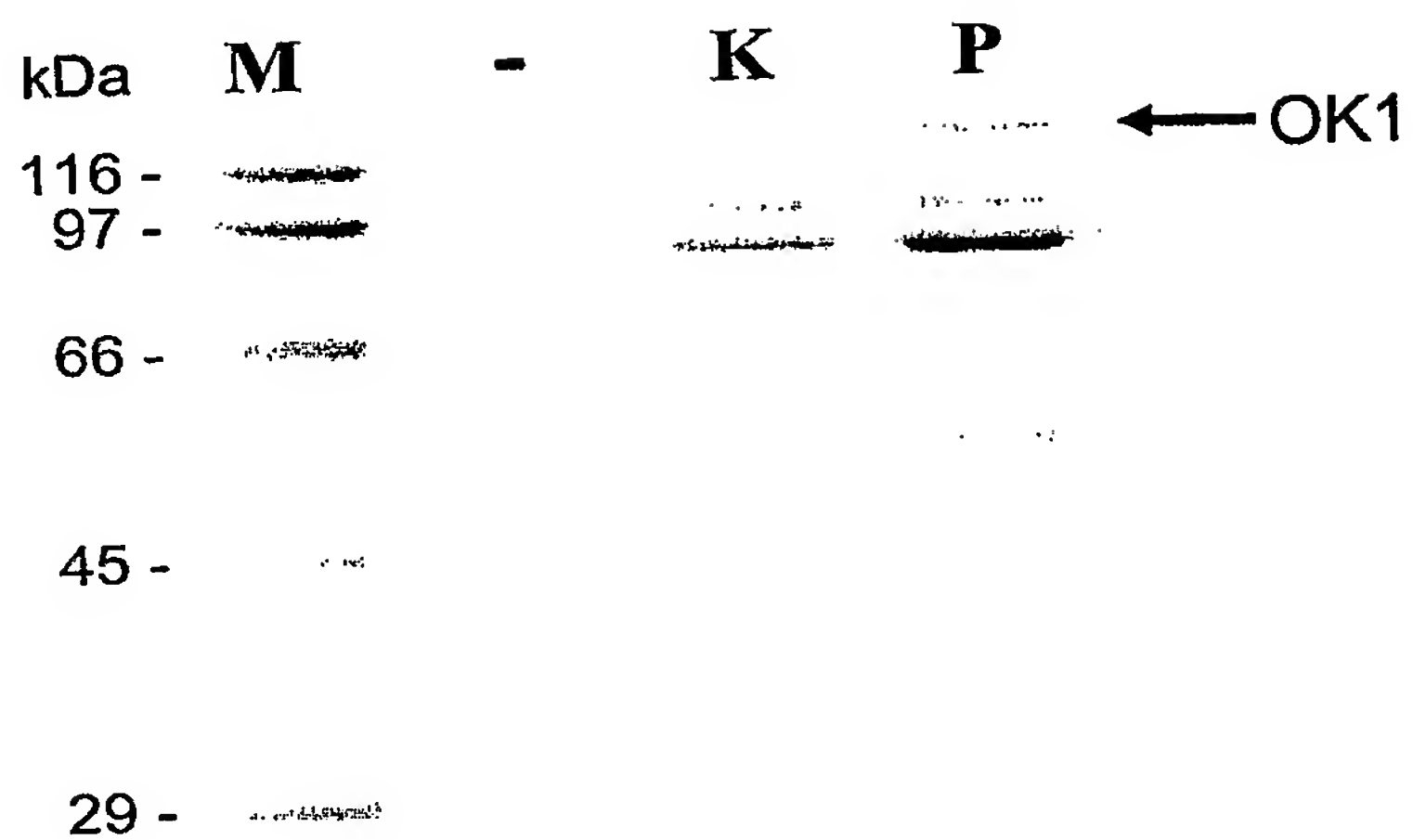


Fig. 1

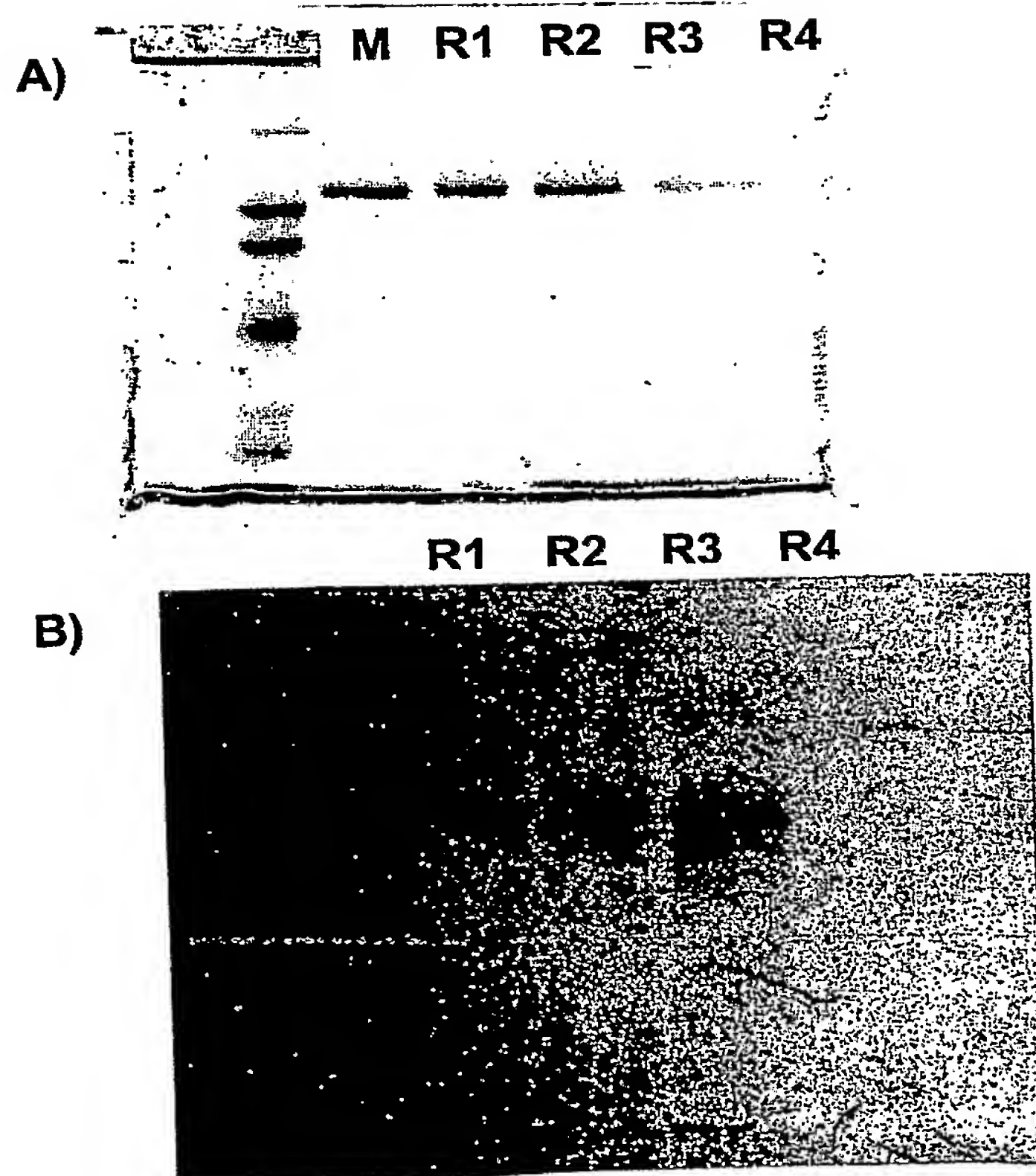


Fig. 2

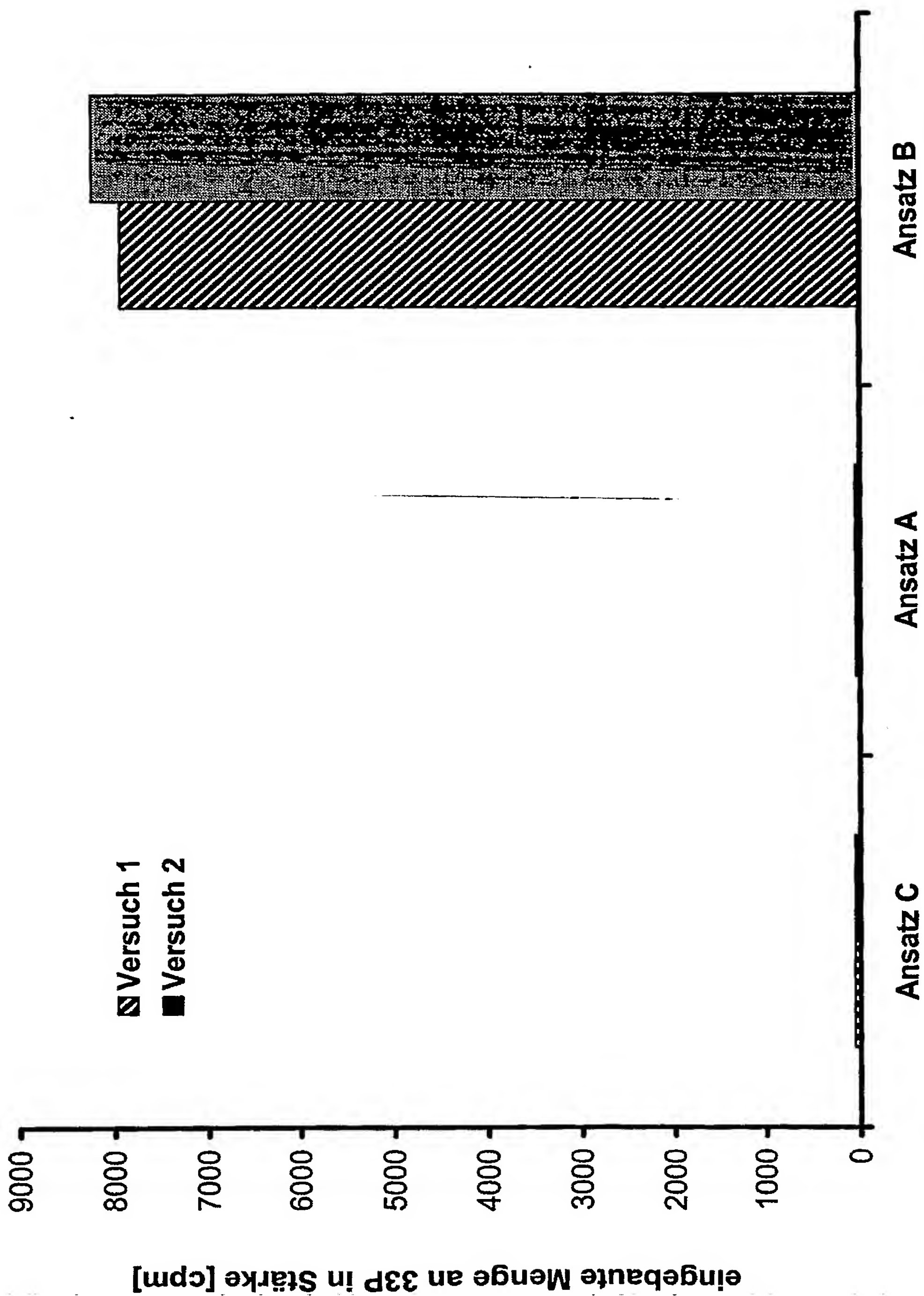


Fig.: 3

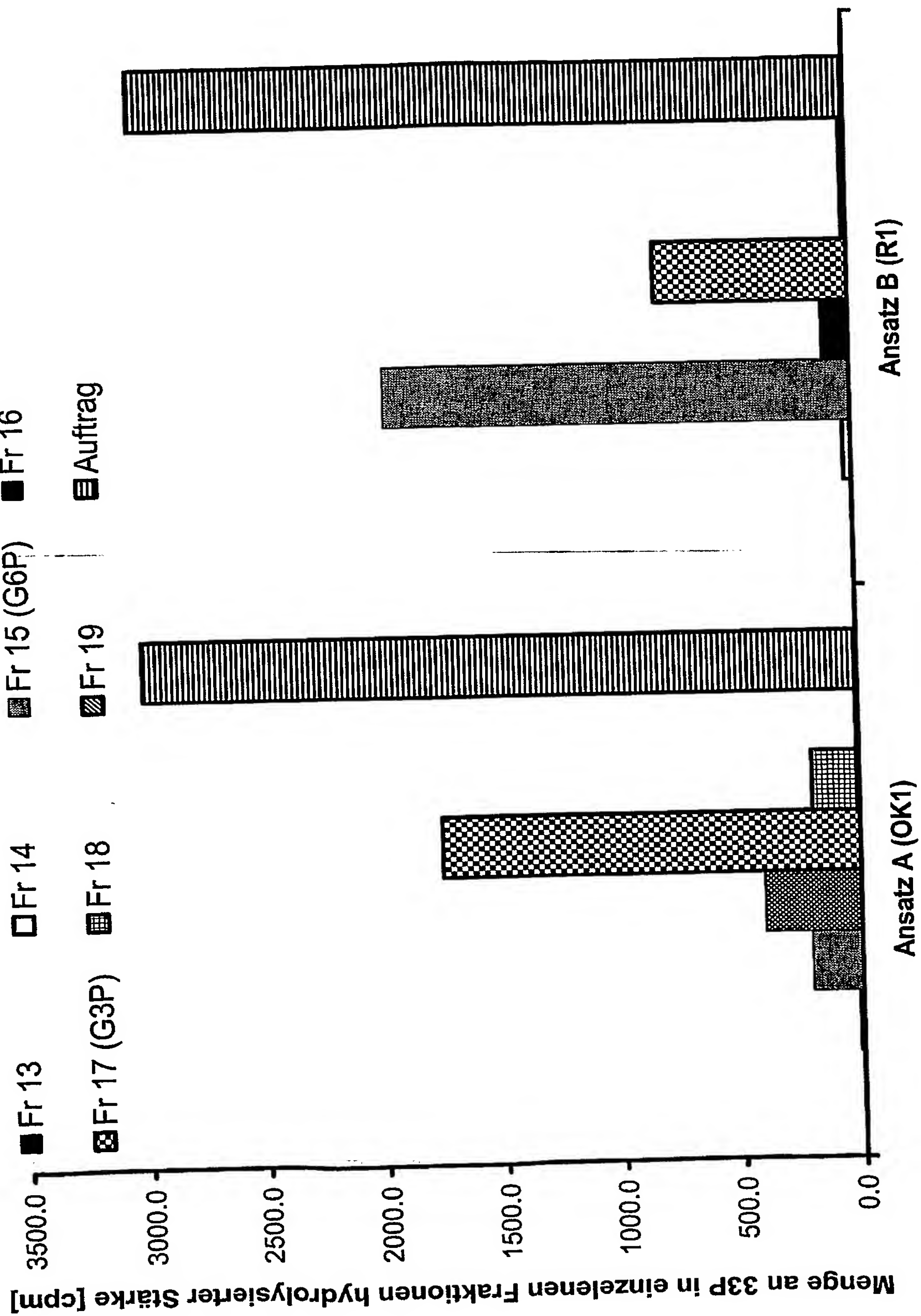


Fig. 4

4 / 5

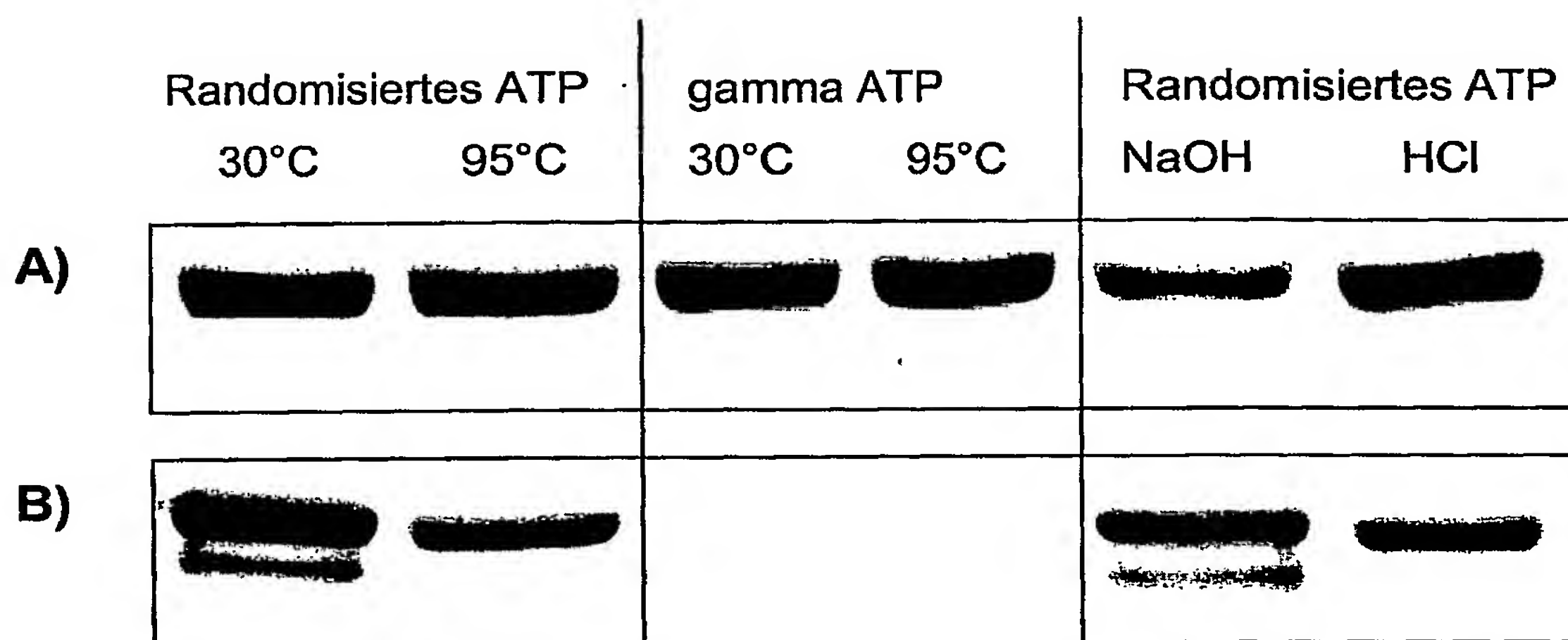


Fig. 5

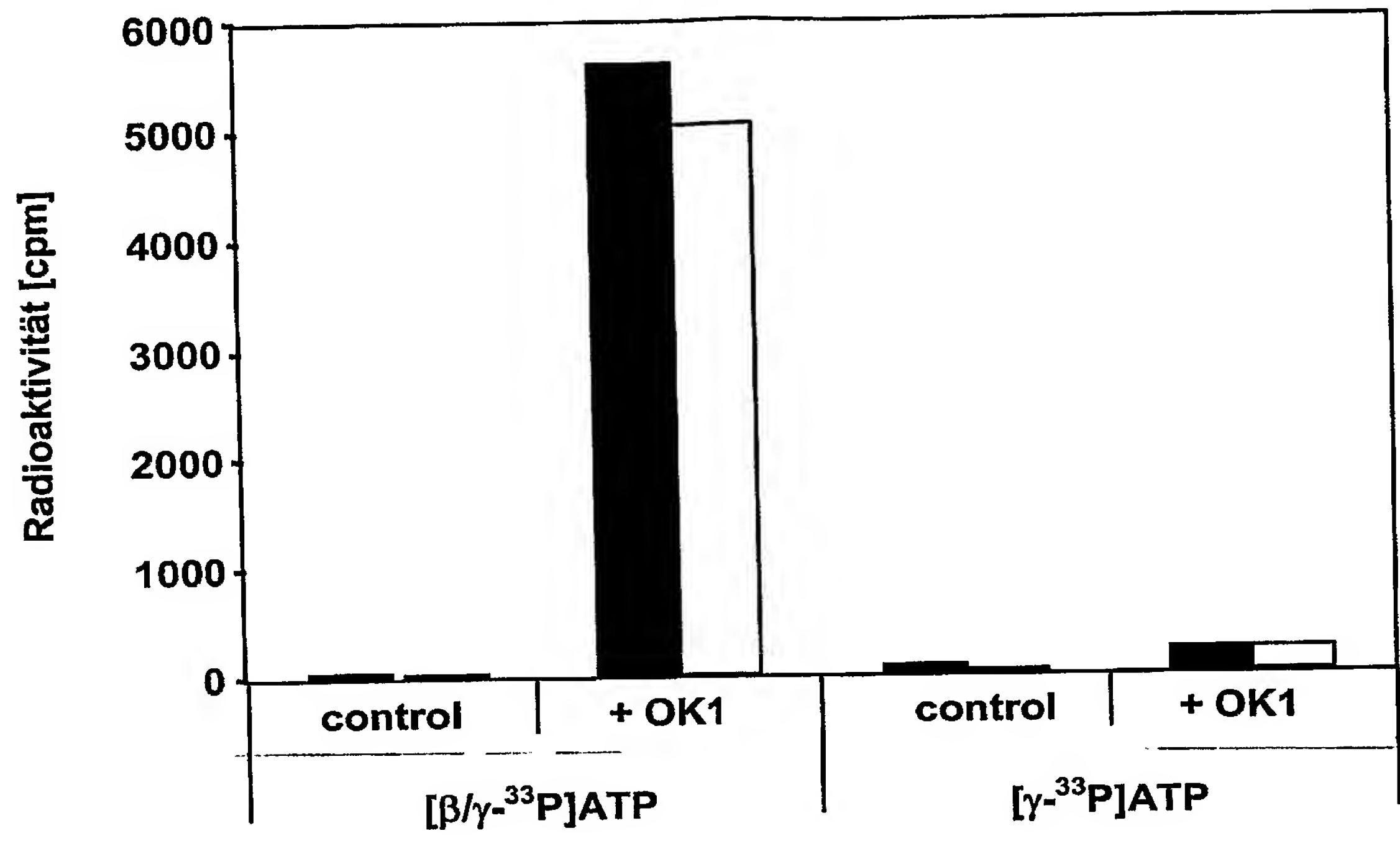


Fig. 6

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
SEQUENCE LISTING

05-03-2004

<110> Bayer CropScience GmbH

<120> Pflanzen mit erhöhter Aktivität eines Stärke phosphorylierenden Enzyms

<130> BCS 04-5002-EP

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3591

<212> DNA

<213> Arabidopsis thaliana

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3591)

<223>

<400> 1	
atg gag agc att ggc agc cat tgt tgc agc tct cct ttc acc ttc atc	48
Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile	
1 5 10 15	
act aga aac tca tca tca tca ctt cct aga ctc gtt aac atc act cac	96
Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His	
20 25 30	
aga gtt aat ctc agc cac caa tct cac cga ctc aga aac tcc aat tct	144
Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser	
35 40 45	
cgt ctc act tgc act gct act tct tct tcc acc att gag gaa caa cgg	192
Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg	
50 55 60	
aag aag aaa gat gga tca gga acg aaa gtg agg ttg aat gtg agg tta	240
Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu	
65 70 75 80	
gat cat caa gtt aat ttt ggt gac cat gtg gct atg ttt gga tca gct	288
Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala	
85 90 95	

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

aaa	gag	att	ggt	tca	tgg	aaa	aag	aaa	tcg	cct	ttg	aat	tgg	agt	gag	336
Lys	Glu	Ile	Gly	Ser	Trp	Lys	Lys	Lys	Ser	Pro	Leu	Asn	Trp	Ser	Glu	
			100					105					110			
aat	gga	tgg	gtt	tgt	gag	ttg	gaa	ctt	gac	ggt	ggt	cag	gtt	ttg	gag	384
Asn	Gly	Trp	Val	Cys	Glu	Leu	Glu	Leu	Asp	Gly	Gly	Gln	Val	Leu	Glu	
		115					120					125				
tat	aag	ttt	gtc	att	gtt	aag	aat	gat	ggt	tca	ctt	tca	tgg	gaa	tct	432
Tyr	Lys	Phe	Val	Ile	Val	Lys	Asn	Asp	Gly	Ser	Leu	Ser	Trp	Glu	Ser	
	130					135					140					
ggt	gat	aat	cgt	gtc	ctt	aag	gtt	cca	aat	tct	ggg	aat	ttt	tct	gtt	480
Gly	Asp	Asn	Arg	Val	Leu	Lys	Val	Pro	Asn	Ser	Gly	Asn	Phe	Ser	Val	
145					150					155					160	
gtt	tgt	cat	tgg	gat	gct	act	aga	gaa	acc	ctt	gat	ttg	cct	cag	gag	528
Val	Cys	His	Trp	Asp	Ala	Thr	Arg	Glu	Thr	Leu	Asp	Leu	Pro	Gln	Glu	
				165					170					175		
gtt	ggt	aat	gat	gat	gat	gtt	ggt	gat	ggt	ggg	cat	gag	agg	gat	aat	576
Val	Gly	Asn	Asp	Asp	Asp	Val	Gly	Asp	Gly	Gly	His	Glu	Arg	Asp	Asn	
			180					185					190			
cat	gat	gtt	ggt	gat	gat	aga	gta	gtg	gga	agt	gaa	aat	ggt	gcg	cag	624
His	Asp	Val	Gly	Asp	Asp	Arg	Val	Val	Gly	Ser	Glu	Asn	Gly	Ala	Gln	
		195					200					205				
ctt	cag	aag	agt	aca	ttg	ggt	ggg	caa	tgg	caa	ggt	aaa	gat	gcg	tcc	672
Leu	Gln	Lys	Ser	Thr	Leu	Gly	Gly	Gln	Trp	Gln	Gly	Lys	Asp	Ala	Ser	
	210					215					220					
ttt	atg	cgt	tct	aat	gat	cat	ggt	aac	aga	gaa	gtt	ggt	aga	aat	tgg	720
Phe	Met	Arg	Ser	Asn	Asp	His	Gly	Asn	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Asn	Trp	
225					230					235					240	
gat	act	agt	ggt	ctt	gaa	ggc	aca	gct	ctt	aag	atg	gtt	gag	ggt	gat	768
Asp	Thr	Ser	Gly	Leu	Glu	Gly	Thr	Ala	Leu	Lys	Met	Val	Glu	Gly	Asp	
				245					250					255		
cgc	aac	tct	aag	aac	tgg	tgg	aga	aag	ctt	gaa	atg	gta	cgc	gag	gtt	816
Arg	Asn	Ser	Lys	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Met	Val	Arg	Glu	Val	
			260					265					270			
ata	gtt	ggg	agt	gtt	gag	agg	gag	gaa	cga	ttg	aag	gcg	ctc	ata	tac	864
Ile	Val	Gly	Ser	Val	Glu	Arg	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Ala	Leu	Ile	Tyr	
		275					280					285				
tct	gca	att	tat	ttg	aag	tgg	ata	aac	aca	ggt	cag	att	cct	tgt	ttt	912
Ser	Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Asn	Thr	Gly	Gln	Ile	Pro	Cys	Phe	
	290					295					300					
gaa	gat	gga	ggg	cat	cac	cgt	cca	aac	agg	cat	gcc	gag	att	tcc	aga	960
Glu	Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Arg	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg	
305				310						315					320	
ctt	ata	ttc	cgt	gag	ttg	gag	cac	att	tgc	agt	aag	aaa	gat	gct	act	1008
Leu	Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	His	Ile	Cys	Ser	Lys	Lys	Asp	Ala	Thr	
				325					330					335		
cca	gag	gaa	gtg	ctt	gtt	gct	cgg	aaa	atc	cat	ccg	tgt	tta	cct	tct	1056
Pro	Glu	Glu	Val	Leu	Val	Ala	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Cys	Leu	Pro	Ser	
			340					345					350			
ttc	aaa	gca	gag	ttt	act	gca	gct	gtc	cct	cta	act	cgg	att	agg	gac	1104
Phe	Lys	Ala	Glu	Phe	Thr	Ala	Ala	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp	
		355					360					365				

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

ata gcc cat cgg aat gat att cct cat gat ctc aag caa gaa atc aag Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys 370 375 380	1152
cat acg ata caa aat aag ctt cac cgg aat gct ggt cca gaa gat cta His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu 385 390 395 400	1200
att gca aca gaa gca atg ctt caa cga att acc gag acc cca gga aaa Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys 405 410 415	1248
tat agt gga gac ttt gtg gag cag ttt aaa ata ttc cat aat gag ctt Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu 420 425 430	1296
aaa gat ttc ttt aat gct gga agt ctc act gaa cag ctt gat tct atg Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met 435 440 445	1344
aaa att tct atg gat gat aga ggt ctt tct gcg ctc aat ttg ttt ttt Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe 450 455 460	1392
gaa tgt aaa aag cgc ctt gac aca tca gga gaa tca agc aat gtt ttg Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu 465 470 475 480	1440
gag ttg att aaa acc atg cat tct cta gct tct tta aga gaa aca att Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile 485 490 495	1488
ata aag gaa ctt aat agc ggc ttg cga aat gat gct cct gat act gcc Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala 500 505 510	1536
att gca atg cgc cag aag tgg cgc ctt tgt gag atc ggc ctc gag gac Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp 515 520 525	1584
tac ttt ttt gtt cta cta agc aga ttc ctc aat gct ctt gaa act atg Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met 530 535 540	1632
gga gga gct gat caa ctg gca aaa gat gtg gga tca aga aac gtt gcc Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala 545 550 555 560	1680
tca tgg aat gat cca cta gat gct ttg gtg ttg ggt gtt cac caa gta Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val 565 570 575	1728
ggt cta tct ggt tgg aag caa gaa gaa tgt tta gcc att gga aat gaa Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu 580 585 590	1776
ctc ctt gct tgg cga gaa agg gac cta ctt gaa aaa gaa ggg gaa gag Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu 595 600 605	1824
gat gga aaa aca att tgg gcc atg agg ctg aaa gca act ctt gat cga Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg 610 615 620	1872
gca cgc aga tta aca gca gaa tat tct gat ttg ctt ctt caa ata ttt Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe 625 630 635 640	1920

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

cct	cct	aat	gtg	gag	att	tta	gga	aaa	gct	cta	gga	att	cca	gag	aat	1968
Pro	Pro	Asn	Val	Glu	Ile	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Gly	Ile	Pro	Glu	Asn	
				645					650					655		
agt	gtc	aag	acc	tat	aca	gaa	gca	gag	att	cgt	gct	gga	att	att	ttc	2016
Ser	Val	Lys	Thr	Tyr	Thr	Glu	Ala	Glu	Ile	Arg	Ala	Gly	Ile	Ile	Phe	
			660					665					670			
cag	atc	tca	aag	ctc	tgc	act	gtt	ctt	cta	aaa	gct	gta	aga	aat	tca	2064
Gln	Ile	Ser	Lys	Leu	Cys	Thr	Val	Leu	Leu	Lys	Ala	Val	Arg	Asn	Ser	
			675				680					685				
ctt	ggt	tct	gag	ggc	tgg	gat	gtc	gtt	gta	cct	gga	tcg	acg	tct	ggg	2112
Leu	Gly	Ser	Glu	Gly	Trp	Asp	Val	Val	Val	Pro	Gly	Ser	Thr	Ser	Gly	
	690					695					700					
aca	tta	gtt	cag	gtt	gag	agc	att	gtt	ccg	gga	tca	ttg	cca	gca	act	2160
Thr	Leu	Val	Gln	Val	Glu	Ser	Ile	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Pro	Ala	Thr	
	705				710					715					720	
tct	ggt	ggt	cct	att	att	ctc	ttg	gtc	aat	aaa	gct	gat	ggc	gat	gaa	2208
Ser	Gly	Gly	Pro	Ile	Ile	Leu	Leu	Val	Asn	Lys	Ala	Asp	Gly	Asp	Glu	
				725					730					735		
gag	gta	agt	gct	gct	aat	ggg	aac	ata	gct	gga	gtc	atg	ctt	ctg	cag	2256
Glu	Val	Ser	Ala	Ala	Asn	Gly	Asn	Ile	Ala	Gly	Val	Met	Leu	Leu	Gln	
			740					745					750			
gag	ctg	cct	cac	ttg	tct	cac	ctt	ggc	gtt	aga	gcg	cgg	cag	gag	aaa	2304
Glu	Leu	Pro	His	Leu	Ser	His	Leu	Gly	Val	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	
		755					760					765				
att	gtc	ttt	gtg	aca	tgt	gat	gat	gat	gac	aag	gtt	gct	gat	ata	cga	2352
Ile	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Val	Ala	Asp	Ile	Arg	
	770					775					780					
cga	ctt	gtg	gga	aaa	ttt	gtg	agg	ttg	gaa	gca	tct	cca	agt	cat	gtg	2400
Arg	Leu	Val	Gly	Lys	Phe	Val	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	Pro	Ser	His	Val	
					790					795					800	
aat	ctg	ata	ctt	tca	act	gag	ggt	agg	agt	cgc	act	tcc	aaa	tcc	agt	2448
Asn	Leu	Ile	Leu	Ser	Thr	Glu	Gly	Arg	Ser	Arg	Thr	Ser	Lys	Ser	Ser	
				805					810					815		
gcg	acc	aaa	aaa	acg	gat	aag	aac	agc	tta	tct	aag	aaa	aaa	aca	gat	2496
Ala	Thr	Lys	Lys	Thr	Asp	Lys	Asn	Ser	Leu	Ser	Lys	Lys	Lys	Thr	Asp	
			820					825					830			
aag	aag	agc	tta	tct	atc	gat	gat	gaa	gaa	tca	aag	cct	ggt	tcc	tca	2544
Lys	Lys	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Asp	Glu	Glu	Ser	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	
		835					840					845				
tct	tcc	aat	agc	ctc	ctt	tac	tct	tcc	aag	gat	atc	cct	agt	gga	gga	2592
Ser	Ser	Asn	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ser	Ser	Lys	Asp	Ile	Pro	Ser	Gly	Gly	
	850					855					860					
atc	ata	gca	ctt	gct	gat	gca	gat	gta	cca	act	tct	ggt	tca	aaa	tct	2640
Ile	Ile	Ala	Leu	Ala	Asp	Ala	Asp	Val	Pro	Thr	Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	
	865				870					875					880	
gct	gca	tgt	ggt	ctt	ctt	gca	tct	tta	gca	gaa	gcc	tct	agt	aaa	gtg	2688
Ala	Ala	Cys	Gly	Leu	Leu	Ala	Ser	Leu	Ala	Glu	Ala	Ser	Ser	Lys	Val	
				885					890					895		
cac	agc	gaa	cac	gga	gtt	ccg	gca	tca	ttt	aag	gtt	cca	act	gga	gtt	2736
His	Ser	Glu	His	Gly	Val	Pro	Ala	Ser	Phe	Lys	Val	Pro	Thr	Gly	Val	
			900					905					910			

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gtc	ata	cct	ttt	gga	tcg	atg	gaa	tta	gct	tta	aag	caa	aat	aat	tcg	2784
Val	Ile	Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Leu	Ala	Leu	Lys	Gln	Asn	Asn	Ser	
		915					920					925				
gaa	gaa	aag	ttt	gcg	tct	ttg	cta	gaa	aaa	cta	gaa	acc	gcc	aga	cct	2832
Glu	Glu	Lys	Phe	Ala	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Leu	Glu	Thr	Ala	Arg	Pro	
	930					935					940					
gag	ggt	ggt	gag	cta	gac	gac	ata	tgt	gac	cag	atc	cat	gaa	gtg	atg	2880
Glu	Gly	Gly	Glu	Leu	Asp	Asp	Ile	Cys	Asp	Gln	Ile	His	Glu	Val	Met	
945					950					955					960	
aaa	acg	ttg	caa	gtg	cct	aaa	gaa	aca	atc	aac	agc	ata	agc	aaa	gcg	2928
Lys	Thr	Leu	Gln	Val	Pro	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	Ser	Ile	Ser	Lys	Ala	
				965					970					975		
ttt	ctc	aaa	gat	gct	cgt	ctc	att	gtt	cgt	tca	agt	gct	aac	gtc	gag	2976
Phe	Leu	Lys	Asp	Ala	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	
			980					985					990			
gac	tta	gcc	gga	atg	tca	gct	gca	gga	ctc	tat	gaa	tca	atc	cct	aac	3024
Asp	Leu	Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Glu	Ser	Ile	Pro	Asn	
		995					1000					1005				
gtg	agt	ccc	tcg	gat	cct	ttg	gtg	ttt	tca	gat	tcg	gtt	tgc	caa		3069
Val	Ser	Pro	Ser	Asp	Pro	Leu	Val	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Cys	Gln		
	1010					1015					1020					
gtt	tgg	gct	tct	ctc	tac	aca	aga	aga	gct	gtt	cta	agc	cgt	aga		3114
Val	Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Val	Leu	Ser	Arg	Arg		
	1025					1030					1035					
gct	gct	ggt	gtc	tct	caa	aga	gaa	gct	tca	atg	gct	gtt	ctc	gtt		3159
Ala	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Arg	Glu	Ala	Ser	Met	Ala	Val	Leu	Val		
	1040					1045					1050					
caa	gaa	atg	ctt	tcg	ccg	gac	tta	tca	ttc	gtt	ctg	cac	aca	gtg		3204
Gln	Glu	Met	Leu	Ser	Pro	Asp	Leu	Ser	Phe	Val	Leu	His	Thr	Val		
	1055					1060					1065					
agt	cca	gct	gat	ccg	gac	agt	aac	ctt	gtg	gaa	gcc	gag	atc	gct		3249
Ser	Pro	Ala	Asp	Pro	Asp	Ser	Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Glu	Ile	Ala		
	1070					1075					1080					
cct	ggt	tta	ggt	gag	act	tta	gct	tca	gga	aca	aga	gga	aca	cca		3294
Pro	Gly	Leu	Gly	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Thr	Arg	Gly	Thr	Pro		
	1085					1090					1095					
tgg	aga	ctc	gct	tcg	ggt	aag	ctc	gac	ggg	att	gta	caa	acc	tta		3339
Trp	Arg	Leu	Ala	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Gly	Ile	Val	Gln	Thr	Leu		
	1100					1105					1110					
gct	ttc	gca	aac	ttc	agc	gaa	gag	ctt	ctt	gtg	tca	gga	aca	ggt		3384
Ala	Phe	Ala	Asn	Phe	Ser	Glu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Gly	Thr	Gly		
	1115					1120					1125					
cct	gct	gat	gga	aaa	tac	gtt	cgg	ttg	acc	gtg	gac	tat	agc	aaa		3429
Pro	Ala	Asp	Gly	Lys	Tyr	Val	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Lys		
	1130					1135					1140					
aaa	cgt	tta	act	gtt	gac	tcg	gtg	ttt	aga	cag	cag	ctc	ggt	cag		3474
Lys	Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Ser	Val	Phe	Arg	Gln	Gln	Leu	Gly	Gln		
	1145					1150					1155					
aga	ctc	ggt	tcg	gtt	ggt	ttc	ttc	ttg	gaa	aga	aac	ttt	ggc	tgt		3519
Arg	Leu	Gly	Ser	Val	Gly	Phe	Phe	Leu	Glu	Arg	Asn	Phe	Gly	Cys		
	1160					1165					1170					

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

gct caa gac gtt gaa ggt tgt ttg gtt ggt gaa gat gtt tac att 3564
Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
1175 1180 1185

ggt cag tca agg cca caa cct ctg tag 3591
Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
1190 1195

<210> 2

<211> 1196

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana

<400> 2

Met Glu Ser Ile Gly Ser His Cys Cys Ser Ser Pro Phe Thr Phe Ile
1 5 10 15

Thr Arg Asn Ser Ser Ser Ser Leu Pro Arg Leu Val Asn Ile Thr His
20 25 30

Arg Val Asn Leu Ser His Gln Ser His Arg Leu Arg Asn Ser Asn Ser
35 40 45

Arg Leu Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Ser Thr Ile Glu Glu Gln Arg
50 55 60

Lys Lys Lys Asp Gly Ser Gly Thr Lys Val Arg Leu Asn Val Arg Leu
65 70 75 80

Asp His Gln Val Asn Phe Gly Asp His Val Ala Met Phe Gly Ser Ala
85 90 95

Lys Glu Ile Gly Ser Trp Lys Lys Lys Ser Pro Leu Asn Trp Ser Glu
100 105 110

Asn Gly Trp Val Cys Glu Leu Glu Leu Asp Gly Gly Gln Val Leu Glu
115 120 125

Tyr Lys Phe Val Ile Val Lys Asn Asp Gly Ser Leu Ser Trp Glu Ser
130 135 140

Gly Asp Asn Arg Val Leu Lys Val Pro Asn Ser Gly Asn Phe Ser Val
145 150 155 160

Val Cys His Trp Asp Ala Thr Arg Glu Thr Leu Asp Leu Pro Gln Glu
165 170 175

Val Gly Asn Asp Asp Asp Val Gly Asp Gly Gly His Glu Arg Asp Asn
180 185 190

His Asp Val Gly Asp Asp Arg Val Val Gly Ser Glu Asn Gly Ala Gln
195 200 205

Leu Gln Lys Ser Thr Leu Gly Gly Gln Trp Gln Gly Lys Asp Ala Ser
210 215 220

Phe Met Arg Ser Asn Asp His Gly Asn Arg Glu Val Gly Arg Asn Trp
225 230 235 240

Asp Thr Ser Gly Leu Glu Gly Thr Ala Leu Lys Met Val Glu Gly Asp
245 250 255

Arg Asn Ser Lys Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Met Val Arg Glu Val
260 265 270

Ile Val Gly Ser Val Glu Arg Glu Glu Arg Leu Lys Ala Leu Ile Tyr
275 280 285

Ser Ala Ile Tyr Leu Lys Trp Ile Asn Thr Gly Gln Ile Pro Cys Phe
290 295 300

Glu Asp Gly Gly His His Arg Pro Asn Arg His Ala Glu Ile Ser Arg
305 310 315 320

Leu Ile Phe Arg Glu Leu Glu His Ile Cys Ser Lys Lys Asp Ala Thr
325 330 335

Pro Glu Glu Val Leu Val Ala Arg Lys Ile His Pro Cys Leu Pro Ser
340 345 350

Phe Lys Ala Glu Phe Thr Ala Ala Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp
355 360 365

Ile Ala His Arg Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys
370 375 380

His Thr Ile Gln Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu
385 390 395 400

Ile Ala Thr Glu Ala Met Leu Gln Arg Ile Thr Glu Thr Pro Gly Lys
405 410 415

Tyr Ser Gly Asp Phe Val Glu Gln Phe Lys Ile Phe His Asn Glu Leu
420 425 430

Lys Asp Phe Phe Asn Ala Gly Ser Leu Thr Glu Gln Leu Asp Ser Met
435 440 445

Lys Ile Ser Met Asp Asp Arg Gly Leu Ser Ala Leu Asn Leu Phe Phe
450 455 460

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Glu Cys Lys Lys Arg Leu Asp Thr Ser Gly Glu Ser Ser Asn Val Leu
 465 470 475 480
 Glu Leu Ile Lys Thr Met His Ser Leu Ala Ser Leu Arg Glu Thr Ile
 485 490 495
 Ile Lys Glu Leu Asn Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp Thr Ala
 500 505 510
 Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Gly Leu Glu Asp
 515 520 525
 Tyr Phe Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Leu Asn Ala Leu Glu Thr Met
 530 535 540
 Gly Gly Ala Asp Gln Leu Ala Lys Asp Val Gly Ser Arg Asn Val Ala
 545 550 555 560
 Ser Trp Asn Asp Pro Leu Asp Ala Leu Val Leu Gly Val His Gln Val
 565 570 575
 Gly Leu Ser Gly Trp Lys Gln Glu Glu Cys Leu Ala Ile Gly Asn Glu
 580 585 590
 Leu Leu Ala Trp Arg Glu Arg Asp Leu Leu Glu Lys Glu Gly Glu Glu
 595 600 605
 Asp Gly Lys Thr Ile Trp Ala Met Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp Arg
 610 615 620
 Ala Arg Arg Leu Thr Ala Glu Tyr Ser Asp Leu Leu Leu Gln Ile Phe
 625 630 635 640
 Pro Pro Asn Val Glu Ile Leu Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Glu Asn
 645 650 655
 Ser Val Lys Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Ile Phe
 660 665 670
 Gln Ile Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Leu Lys Ala Val Arg Asn Ser
 675 680 685
 Leu Gly Ser Glu Gly Trp Asp Val Val Val Pro Gly Ser Thr Ser Gly
 690 695 700
 Thr Leu Val Gln Val Glu Ser Ile Val Pro Gly Ser Leu Pro Ala Thr
 705 710 715 720
 Ser Gly Gly Pro Ile Ile Leu Leu Val Asn Lys Ala Asp Gly Asp Glu
 725 730 735

Glu Val Ser Ala Ala Asn Gly Asn Ile Ala Gly Val Met Leu Leu Gln
 740 745 750
 Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu Lys
 755 760 765
 Ile Val Phe Val Thr Cys Asp Asp Asp Asp Lys Val Ala Asp Ile Arg
 770 775 780
 Arg Leu Val Gly Lys Phe Val Arg Leu Glu Ala Ser Pro Ser His Val
 785 790 795 800
 Asn Leu Ile Leu Ser Thr Glu Gly Arg Ser Arg Thr Ser Lys Ser Ser
 805 810 815
 Ala Thr Lys Lys Thr Asp Lys Asn Ser Leu Ser Lys Lys Lys Thr Asp
 820 825 830
 Lys Lys Ser Leu Ser Ile Asp Asp Glu Glu Ser Lys Pro Gly Ser Ser
 835 840 845
 Ser Ser Asn Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Ile Pro Ser Gly Gly
 850 855 860
 Ile Ile Ala Leu Ala Asp Ala Asp Val Pro Thr Ser Gly Ser Lys Ser
 865 870 875 880
 Ala Ala Cys Gly Leu Leu Ala Ser Leu Ala Glu Ala Ser Ser Lys Val
 885 890 895
 His Ser Glu His Gly Val Pro Ala Ser Phe Lys Val Pro Thr Gly Val
 900 905 910
 Val Ile Pro Phe Gly Ser Met Glu Leu Ala Leu Lys Gln Asn Asn Ser
 915 920 925
 Glu Glu Lys Phe Ala Ser Leu Leu Glu Lys Leu Glu Thr Ala Arg Pro
 930 935 940
 Glu Gly Gly Glu Leu Asp Asp Ile Cys Asp Gln Ile His Glu Val Met
 945 950 955 960
 Lys Thr Leu Gln Val Pro Lys Glu Thr Ile Asn Ser Ile Ser Lys Ala
 965 970 975
 Phe Leu Lys Asp Ala Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu
 980 985 990
 Asp Leu Ala Gly Met Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Glu Ser Ile Pro Asn
 995 1000 1005

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Val Ser Pro Ser Asp Pro Leu Val Phe Ser Asp Ser Val Cys Gln
1010 1015 1020

Val Trp Ala Ser Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Val Leu Ser Arg Arg
1025 1030 1035

Ala Ala Gly Val Ser Gln Arg Glu Ala Ser Met Ala Val Leu Val
1040 1045 1050

Gln Glu Met Leu Ser Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val
1055 1060 1065

Ser Pro Ala Asp Pro Asp Ser Asn Leu Val Glu Ala Glu Ile Ala
1070 1075 1080

Pro Gly Leu Gly Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro
1085 1090 1095

Trp Arg Leu Ala Ser Gly Lys Leu Asp Gly Ile Val Gln Thr Leu
1100 1105 1110

Ala Phe Ala Asn Phe Ser Glu Glu Leu Leu Val Ser Gly Thr Gly
1115 1120 1125

Pro Ala Asp Gly Lys Tyr Val Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys
1130 1135 1140

Lys Arg Leu Thr Val Asp Ser Val Phe Arg Gln Gln Leu Gly Gln
1145 1150 1155

Arg Leu Gly Ser Val Gly Phe Phe Leu Glu Arg Asn Phe Gly Cys
1160 1165 1170

Ala Gln Asp Val Glu Gly Cys Leu Val Gly Glu Asp Val Tyr Ile
1175 1180 1185

Val Gln Ser Arg Pro Gln Pro Leu
1190 1195

<210> 3

<211> 3644

<212> DNA

<213> Oryza sativa

<220>

<221> CDS

<223>

<400> 3

[illegible]

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Met	Arg	Ser	Asn	Glu	His	Leu	Asn	Lys	Glu	Ala	Asp	Arg	Met	Trp	Asp	
		240					245				250					
aca	act	ggg	ctt	gat	gga	ata	gca	ctg	aaa	ctg	gtg	gag	ggc	gat	aaa	819
Thr	Thr	Gly	Leu	Asp	Gly	Ile	Ala	Leu	Lys	Leu	Val	Glu	Gly	Asp	Lys	
		255				260					265					
gca	tcc	agg	aac	tgg	tgg	cgg	aag	tta	gag	gtt	gtt	cgc	ggg	ata	ttg	867
Ala	Ser	Arg	Asn	Trp	Trp	Arg	Lys	Leu	Glu	Val	Val	Arg	Gly	Ile	Leu	
					275					280					285	
tca	gaa	tct	ttt	gat	gac	cag	agt	cgt	ctg	ggg	gcc	ctt	gta	tac	tca	915
Ser	Glu	Ser	Phe	Asp	Asp	Gln	Ser	Arg	Leu	Gly	Ala	Leu	Val	Tyr	Ser	
				290					295					300		
gct	att	tat	ctg	aag	tgg	att	tat	aca	ggt	cag	ata	tcg	tgc	ttt	gaa	963
Ala	Ile	Tyr	Leu	Lys	Trp	Ile	Tyr	Thr	Gly	Gln	Ile	Ser	Cys	Phe	Glu	
			305					310					315			
gat	ggt	ggc	cac	cat	cgg	cct	aac	aaa	cat	gct	gag	ata	tcg	agg	caa	1011
Asp	Gly	Gly	His	His	Arg	Pro	Asn	Lys	His	Ala	Glu	Ile	Ser	Arg	Gln	
		320					325					330				
ata	ttc	cgt	gaa	ctt	gaa	atg	atg	tat	tat	ggg	aaa	acc	aca	tca	gcc	1059
Ile	Phe	Arg	Glu	Leu	Glu	Met	Met	Tyr	Tyr	Gly	Lys	Thr	Thr	Ser	Ala	
		335				340					345					
aag	gat	gtt	ctc	gtg	att	cgc	aaa	att	cat	ccc	ttt	tta	cct	tca	ttt	1107
Lys	Asp	Val	Leu	Val	Ile	Arg	Lys	Ile	His	Pro	Phe	Leu	Pro	Ser	Phe	
					355					360					365	
aag	tca	gag	ttt	aca	gcc	tct	gtc	cct	cta	aca	cga	att	cgt	gat	att	1155
Lys	Ser	Glu	Phe	Thr	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Thr	Arg	Ile	Arg	Asp	Ile	
				370					375					380		
gct	cac	cgg	aat	gac	atc	cca	cat	gat	ctc	aag	caa	gaa	atc	aag	cat	1203
Ala	His	Arg	Asn	Asp	Ile	Pro	His	Asp	Leu	Lys	Gln	Glu	Ile	Lys	His	
			385					390					395			
act	ata	caa	aac	aaa	ctt	cat	cgt	aat	gct	gga	cct	gag	gat	ctt	att	1251
Thr	Ile	Gln	Asn	Lys	Leu	His	Arg	Asn	Ala	Gly	Pro	Glu	Asp	Leu	Ile	
		400					405					410				
gct	aca	gaa	gtc	atg	ctt	gct	agg	att	act	aag	acc	cct	gga	gaa	tac	1299
Ala	Thr	Glu	Val	Met	Leu	Ala	Arg	Ile	Thr	Lys	Thr	Pro	Gly	Glu	Tyr	
		415				420					425					
agt	gaa	aca	ttt	gtt	gaa	caa	ttc	acg	ata	ttt	tat	agc	gaa	cta	aaa	1347
Ser	Glu	Thr	Phe	Val	Glu	Gln	Phe	Thr	Ile	Phe	Tyr	Ser	Glu	Leu	Lys	
					435					440					445	
gat	ttc	ttc	aat	gct	ggc	agc	cta	ttt	gag	caa	ctg	gag	tcc	atc	aag	1395
Asp	Phe	Phe	Asn	Ala	Gly	Ser	Leu	Phe	Glu	Gln	Leu	Glu	Ser	Ile	Lys	
				450					455					460		
gaa	tct	ctg	aac	gag	tca	ggc	tta	gaa	gtt	ctc	tca	tcc	ttt	gtg	gaa	1443
Glu	Ser	Leu	Asn	Glu	Ser	Gly	Leu	Glu	Val	Leu	Ser	Ser	Phe	Val	Glu	
			465					470					475			
acc	aaa	agg	agt	ttg	gac	caa	gtg	gat	cat	gca	gaa	gat	ttg	gat	aaa	1491
Thr	Lys	Arg	Ser	Leu	Asp	Gln	Val	Asp	His	Ala	Glu	Asp	Leu	Asp	Lys	
			480				485					490				
aat	gat	acc	att	caa	att	ttg	atg	act	acc	ttg	caa	tca	tta	tct	tct	1539
Asn	Asp	Thr	Ile	Gln	Ile	Leu	Met	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Leu	Ser	Ser	
						500					505					
cta	aga	tcg	gtt	cta	atg	aag	ggc	ctt	gaa	agt	ggc	ctt	aga	aat	gat	1587

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Leu Arg Ser Val	Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp	510	515	520	525	
gcg cct gat aat gct ata gca atg cga caa aag tgg cgc ctt tgt gaa	Ala Pro Asp Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu		530	535	540	1635
att agt ctt gag gat tat tca ttt gtt ctg tta agc aga ttc atc aat	Ile Ser Leu Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn		545	550	555	1683
act ctt gaa gcc tta ggt gga tca gct tca ctt gca aag gat gta gct	Thr Leu Glu Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala		560	565	570	1731
aga aat act act cta tgg gat act act ctt gat gcc ctt gtc att ggc	Arg Asn Thr Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly		575	580	585	1779
atc aat caa gtt agc ttt tca ggt tgg aaa aca gat gaa tgt att gcc	Ile Asn Gln Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala		590	595	600	1827
ata ggg aat gag att ctt tcc tgg aag caa aaa ggt cta tct gaa agt	Ile Gly Asn Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser		610	615	620	1875
gaa ggt tgt gaa gat ggg aaa tat att tgg tca cta aga ctt aaa gct	Glu Gly Cys Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala		625	630	635	1923
aca ctg gac aga gca cgg aga tta acg gaa gag tac tct gaa gca ctt	Thr Leu Asp Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu		640	645	650	1971
ctt tct ata ttc cct gaa aaa gta atg gtt att ggg aaa gcc ctt gga	Leu Ser Ile Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly		655	660	665	2019
ata cca gat aac agt gtg aga act tac aca gag gca gaa att cgt gct	Ile Pro Asp Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala		670	675	680	2067
ggc att gtt ttt cag gta tct aaa cta tgc aca gta ctt cag aaa gca	Gly Ile Val Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala		690	695	700	2115
att cga gaa gta ctt gga tca act ggc tgg gat gtt ctt gtt cct gga	Ile Arg Glu Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly		705	710	715	2163
gtg gcc cat gga act ctg atg cgg gtg gaa aga att ctt cct gga tca	Val Ala His Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser		720	725	730	2211
tta cct tca tct gtc aaa gaa cct gtg gtt cta att gta gat aag gct	Leu Pro Ser Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala		735	740	745	2259
gat gga gat gaa gag gtc aaa gct gct ggg gat aat ata gtt ggt gtt	Asp Gly Asp Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val		750	755	760	2307
att ctt ctt cag gaa cta cct cac ctt tca cat ctt ggt gtt aga gct	Ile Leu Leu Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala		770	775	780	2355
cggt caa gag aat gtt gta ttt gta act tgt gaa tat gat gac aca gtt						2403

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Arg	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Phe	Val	Thr	Cys	Glu	Tyr	Asp	Asp	Thr	Val	
			785					790					795			
aca	gat	gtg	tat	ttg	ctt	gag	gga	aaa	tat	atc	aga	tta	gaa	gca	tca	2451
Thr	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ile	Arg	Leu	Glu	Ala	Ser	
		800					805					810				
tcc	atc	aat	gtc	aat	ctc	tca	ata	gtt	tca	gaa	aaa	aat	gac	aat	gct	2499
Ser	Ile	Asn	Val	Asn	Leu	Ser	Ile	Val	Ser	Glu	Lys	Asn	Asp	Asn	Ala	
		815				820					825					
gtc	tct	aca	gaa	cca	aat	agt	aca	ggg	aat	cca	ttt	caa	cag	aaa	ctc	2547
Val	Ser	Thr	Glu	Pro	Asn	Ser	Thr	Gly	Asn	Pro	Phe	Gln	Gln	Lys	Leu	
		830			835					840					845	
caa	aat	gaa	ttc	tct	cta	cca	tcg	gat	atc	gag	atg	cca	ctg	caa	atg	2595
Gln	Asn	Glu	Phe	Ser	Leu	Pro	Ser	Asp	Ile	Glu	Met	Pro	Leu	Gln	Met	
				850					855					860		
tct	aag	caa	aaa	agc	aaa	tca	gga	gtg	aat	ggc	agt	ttt	gct	gct	ctt	2643
Ser	Lys	Gln	Lys	Ser	Lys	Ser	Gly	Val	Asn	Gly	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	
			865					870					875			
gag	ctt	tca	gaa	gct	tca	gtg	gaa	tca	gct	ggc	gca	aaa	gct	gct	gca	2691
Glu	Leu	Ser	Glu	Ala	Ser	Val	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	
		880					885					890				
tgc	aga	act	ctt	tct	gtt	ctt	gct	tca	ttg	tct	aat	aaa	gtc	tat	agt	2739
Cys	Arg	Thr	Leu	Ser	Val	Leu	Ala	Ser	Leu	Ser	Asn	Lys	Val	Tyr	Ser	
		895				900					905					
gat	caa	gga	gtt	cca	gca	gcc	ttt	aga	gtc	cct	tct	ggc	gct	gtg	ata	2787
Asp	Gln	Gly	Val	Pro	Ala	Ala	Phe	Arg	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Val	Ile	
					915					920					925	
cca	ttt	gga	tca	atg	gag	gat	gcg	ctc	aag	aaa	agt	gga	tca	ctg	gaa	2835
Pro	Phe	Gly	Ser	Met	Glu	Asp	Ala	Leu	Lys	Lys	Ser	Gly	Ser	Leu	Glu	
				930					935					940		
tcc	ttt	aca	agc	ctt	cta	gaa	aag	att	gaa	aca	gcc	aaa	gtc	gaa	aat	2883
Ser	Phe	Thr	Ser	Leu	Leu	Glu	Lys	Ile	Glu	Thr	Ala	Lys	Val	Glu	Asn	
			945					950					955			
ggc	gaa	gtt	gat	agc	ctg	gcg	ttg	gag	cta	caa	gca	ata	att	tca	cat	2931
Gly	Glu	Val	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Glu	Leu	Gln	Ala	Ile	Ile	Ser	His	
		960					965					970				
ctt	tcc	cca	ccg	gag	gag	act	att	ata	ttt	ctc	aaa	aga	atc	ttc	cca	2979
Leu	Ser	Pro	Pro	Glu	Glu	Thr	Ile	Ile	Phe	Leu	Lys	Arg	Ile	Phe	Pro	
		975				980					985					
cag	gat	gtc	cgg	ttg	att	gtt	aga	tct	agt	gct	aat	gtg	gag	gat	ttg	3027
Gln	Asp	Val	Arg	Leu	Ile	Val	Arg	Ser	Ser	Ala	Asn	Val	Glu	Asp	Leu	
					995					1000					1005	
gct	ggc	atg	tca	gct	gct	ggc	ctc	tat	gat	tca	att	ccc	aat	gtc		3072
Ala	Gly	Met	Ser	Ala	Ala	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	Ile	Pro	Asn	Val		
				1010					1015					1020		
agt	ctc	atg	gac	cca	tgt	gcc	ttt	gga	gct	gcg	gtt	ggg	aag	gtt		3117
Ser	Leu	Met	Asp	Pro	Cys	Ala	Phe	Gly	Ala	Ala	Val	Gly	Lys	Val		
				1025					1030					1035		
tgg	gct	tct	tta	tac	aca	agg	aga	gcc	atc	cta	agc	cgt	cga	gcc		3162
Trp	Ala	Ser	Leu	Tyr	Thr	Arg	Arg	Ala	Ile	Leu	Ser	Arg	Arg	Ala		
				1040					1045					1050		
gct	ggc	gtt	tat	cag	aga	gac	gcg	aca	atg	gct	gtt	ctt	gtc	caa		3207

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25

Ala Gly Val Tyr	Gln	Arg Asp Ala Thr Met	Ala Val Leu Val Gln	
	1055	1060	1065	
gaa ata ctg cag cca	gat ctc tcc ttc gtg	ctt cat act gtt tgc		3252
Glu Ile Leu Gln Pro	Asp Leu Ser Phe Val	Leu His Thr Val Cys		
	1070	1075	1080	
ccc gct gac cat gac	ccc aag gtt gtc cag	gct gag gtc gcc cct		3297
Pro Ala Asp His Asp	Pro Lys Val Val Gln	Ala Glu Val Ala Pro		
	1085	1090	1095	
ggg ctg ggt gaa acg	ctt gct tca gga acc	cgt ggc acc ccg tgg		3342
Gly Leu Gly Glu Thr	Leu Ala Ser Gly Thr	Arg Gly Thr Pro Trp		
	1100	1105	1110	
agg ctg tca tgt aac	aaa ttc gat gga aaa	gtt gcc act ctt gcc		3387
Arg Leu Ser Cys Asn	Lys Phe Asp Gly Lys	Val Ala Thr Leu Ala		
	1115	1120	1125	
ttt tca aat ttc agt	gag gag atg gtg gtg	cac aac tct ggt cct		3432
Phe Ser Asn Phe Ser	Glu Glu Met Val Val	His Asn Ser Gly Pro		
	1130	1135	1140	
gcc aat gga gaa gta	att cgt ctt act gtt	gat tac agc aag aag		3477
Ala Asn Gly Glu Val	Ile Arg Leu Thr Val	Asp Tyr Ser Lys Lys		
	1145	1150	1155	
cca ttg tcg gtt gat	aca acc ttt agg aag	cag ttt ggt cag cga		3522
Pro Leu Ser Val Asp	Thr Thr Phe Arg Lys	Gln Phe Gly Gln Arg		
	1160	1165	1170	
ctg gct gcg att ggc	cag tat ctg gag cag	aag ttc ggg agt gca		3567
Leu Ala Ala Ile Gly	Gln Tyr Leu Glu Gln	Lys Phe Gly Ser Ala		
	1175	1180	1185	
cag gat gtg gaa ggt	tgc ctg gtt ggg aaa	gat att ttt ata gtg		3612
Gln Asp Val Glu Gly	Cys Leu Val Gly Lys	Asp Ile Phe Ile Val		
	1190	1195	1200	
caa agc agg cca cag	cca tag aagccgaatt c			3644
Gln Ser Arg Pro Gln	Pro			
	1205			

<210> 4

<211> 1206

<212> PRT

<213> Oryza sativa

<400> 4

Met Thr Ser Leu Arg	Pro Leu Glu Thr Ser	Leu Ser Ile Gly Gly Arg
1	5	10

Pro Arg Arg Gly Leu Val	Leu Pro Pro Gly Val Gly	Ala Gly Val
20	25	30

Leu Leu Arg Arg Gly	Ala Met Ala Leu Pro	Gly Arg Arg Gly Phe Ala
35	40	45

Cys Arg Gly Arg Ser Ala Ala Ser Ala Ala Glu Arg Thr Lys Glu Lys
 50 55 60

Lys Arg Arg Asp Ser Ser Lys Gln Pro Leu Val His Leu Gln Val Cys
 65 70 75 80

Leu Glu His Gln Val Lys Phe Gly Glu His Val Gly Ile Ile Gly Ser
 85 90 95

Thr Lys Glu Leu Gly Ser Trp Glu Glu Gln Val Glu Leu Glu Trp Thr
 100 105 110

Thr Asn Gly Trp Val Cys Gln Leu Lys Leu Pro Gly Glu Thr Leu Val
 115 120 125

Glu Phe Lys Phe Val Ile Phe Leu Val Gly Gly Lys Asp Lys Ile Trp
 130 135 140

Glu Asp Gly Asn Asn Arg Val Val Glu Leu Pro Lys Asp Gly Lys Phe
 145 150 155 160

Asp Ile Val Cys His Trp Asn Arg Thr Glu Glu Pro Leu Glu Leu Leu
 165 170 175

Gly Thr Pro Lys Phe Glu Leu Val Gly Glu Ala Glu Lys Asn Thr Gly
 180 185 190

Glu Asp Ala Ser Ala Ser Val Thr Phe Ala Pro Glu Lys Val Gln Asp
 195 200 205

Ile Ser Val Val Glu Asn Gly Asp Pro Ala Pro Glu Ala Glu Ser Ser
 210 215 220

Lys Phe Gly Gly Gln Trp Gln Gly Ser Lys Thr Val Phe Met Arg Ser
 225 230 235 240

Asn Glu His Leu Asn Lys Glu Ala Asp Arg Met Trp Asp Thr Thr Gly
 245 250 255

Leu Asp Gly Ile Ala Leu Lys Leu Val Glu Gly Asp Lys Ala Ser Arg
 260 265 270

Asn Trp Trp Arg Lys Leu Glu Val Val Arg Gly Ile Leu Ser Glu Ser
 275 280 285

Phe Asp Asp Gln Ser Arg Leu Gly Ala Leu Val Tyr Ser Ala Ile Tyr
 290 295 300

Leu Lys Trp Ile Tyr Thr Gly Gln Ile Ser Cys Phe Glu Asp Gly Gly
 305 310 315 320

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
His His Arg Pro Asn Lys His Ala Glu Ile Ser Arg Gln Ile Phe Arg
325 330 335

Glu Leu Glu Met Met Tyr Tyr Gly Lys Thr Thr Ser Ala Lys Asp Val
340 345 350

Leu Val Ile Arg Lys Ile His Pro Phe Leu Pro Ser Phe Lys Ser Glu
355 360 365

Phe Thr Ala Ser Val Pro Leu Thr Arg Ile Arg Asp Ile Ala His Arg
370 375 380

Asn Asp Ile Pro His Asp Leu Lys Gln Glu Ile Lys His Thr Ile Gln
385 390 395 400

Asn Lys Leu His Arg Asn Ala Gly Pro Glu Asp Leu Ile Ala Thr Glu
405 410 415

Val Met Leu Ala Arg Ile Thr Lys Thr Pro Gly Glu Tyr Ser Glu Thr
420 425 430

Phe Val Glu Gln Phe Thr Ile Phe Tyr Ser Glu Leu Lys Asp Phe Phe
435 440 445

Asn Ala Gly Ser Leu Phe Glu Gln Leu Glu Ser Ile Lys Glu Ser Leu
450 455 460

Asn Glu Ser Gly Leu Glu Val Leu Ser Ser Phe Val Glu Thr Lys Arg
465 470 475 480

Ser Leu Asp Gln Val Asp His Ala Glu Asp Leu Asp Lys Asn Asp Thr
485 490 495

Ile Gln Ile Leu Met Thr Thr Leu Gln Ser Leu Ser Ser Leu Arg Ser
500 505 510

Val Leu Met Lys Gly Leu Glu Ser Gly Leu Arg Asn Asp Ala Pro Asp
515 520 525

Asn Ala Ile Ala Met Arg Gln Lys Trp Arg Leu Cys Glu Ile Ser Leu
530 535 540

Glu Asp Tyr Ser Phe Val Leu Leu Ser Arg Phe Ile Asn Thr Leu Glu
545 550 555 560

Ala Leu Gly Gly Ser Ala Ser Leu Ala Lys Asp Val Ala Arg Asn Thr
565 570 575

Thr Leu Trp Asp Thr Thr Leu Asp Ala Leu Val Ile Gly Ile Asn Gln
580 585 590

Val Ser Phe Ser Gly Trp Lys Thr Asp Glu Cys Ile Ala Ile Gly Asn
 595 600 605

Glu Ile Leu Ser Trp Lys Gln Lys Gly Leu Ser Glu Ser Glu Gly Cys
 610 615 620

Glu Asp Gly Lys Tyr Ile Trp Ser Leu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Asp
 625 630 635 640

Arg Ala Arg Arg Leu Thr Glu Glu Tyr Ser Glu Ala Leu Leu Ser Ile
 645 650 655

Phe Pro Glu Lys Val Met Val Ile Gly Lys Ala Leu Gly Ile Pro Asp
 660 665 670

Asn Ser Val Arg Thr Tyr Thr Glu Ala Glu Ile Arg Ala Gly Ile Val
 675 680 685

Phe Gln Val Ser Lys Leu Cys Thr Val Leu Gln Lys Ala Ile Arg Glu
 690 695 700

Val Leu Gly Ser Thr Gly Trp Asp Val Leu Val Pro Gly Val Ala His
 705 710 715 720

Gly Thr Leu Met Arg Val Glu Arg Ile Leu Pro Gly Ser Leu Pro Ser
 725 730 735

Ser Val Lys Glu Pro Val Val Leu Ile Val Asp Lys Ala Asp Gly Asp
 740 745 750

Glu Glu Val Lys Ala Ala Gly Asp Asn Ile Val Gly Val Ile Leu Leu
 755 760 765

Gln Glu Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg Gln Glu
 770 775 780

Asn Val Val Phe Val Thr Cys Glu Tyr Asp Asp Thr Val Thr Asp Val
 785 790 795 800

Tyr Leu Leu Glu Gly Lys Tyr Ile Arg Leu Glu Ala Ser Ser Ile Asn
 805 810 815

Val Asn Leu Ser Ile Val Ser Glu Lys Asn Asp Asn Ala Val Ser Thr
 820 825 830

Glu Pro Asn Ser Thr Gly Asn Pro Phe Gln Gln Lys Leu Gln Asn Glu
 835 840 845

Phe Ser Leu Pro Ser Asp Ile Glu Met Pro Leu Gln Met Ser Lys Gln
 850 855 860

BCS 04-5002_Erhöhte Akt. OK1_SEQUENZPROTOKOLL.ST25
Lys Ser Lys Ser Gly Val Asn Gly Ser Phe Ala Ala Leu Glu Leu Ser
865 870 875 880

Glu Ala Ser Val Glu Ser Ala Gly Ala Lys Ala Ala Ala Cys Arg Thr
885 890 895

Leu Ser Val Leu Ala Ser Leu Ser Asn Lys Val Tyr Ser Asp Gln Gly
900 905 910

Val Pro Ala Ala Phe Arg Val Pro Ser Gly Ala Val Ile Pro Phe Gly
915 920 925

Ser Met Glu Asp Ala Leu Lys Lys Ser Gly Ser Leu Glu Ser Phe Thr
930 935 940

Ser Leu Leu Glu Lys Ile Glu Thr Ala Lys Val Glu Asn Gly Glu Val
945 950 955 960

Asp Ser Leu Ala Leu Glu Leu Gln Ala Ile Ile Ser His Leu Ser Pro
965 970 975

Pro Glu Glu Thr Ile Ile Phe Leu Lys Arg Ile Phe Pro Gln Asp Val
980 985 990

Arg Leu Ile Val Arg Ser Ser Ala Asn Val Glu Asp Leu Ala Gly Met
995 1000 1005

Ser Ala Ala Gly Leu Tyr Asp Ser Ile Pro Asn Val Ser Leu Met
1010 1015 1020

Asp Pro Cys Ala Phe Gly Ala Ala Val Gly Lys Val Trp Ala Ser
1025 1030 1035

Leu Tyr Thr Arg Arg Ala Ile Leu Ser Arg Arg Ala Ala Gly Val
1040 1045 1050

Tyr Gln Arg Asp Ala Thr Met Ala Val Leu Val Gln Glu Ile Leu
1055 1060 1065

Gln Pro Asp Leu Ser Phe Val Leu His Thr Val Cys Pro Ala Asp
1070 1075 1080

His Asp Pro Lys Val Val Gln Ala Glu Val Ala Pro Gly Leu Gly
1085 1090 1095

Glu Thr Leu Ala Ser Gly Thr Arg Gly Thr Pro Trp Arg Leu Ser
1100 1105 1110

Cys Asn Lys Phe Asp Gly Lys Val Ala Thr Leu Ala Phe Ser Asn
1115 1120 1125

Phe Ser Glu Glu Met Val Val His Asn Ser Gly Pro Ala Asn Gly
 1130 1135 1140

Glu Val Ile Arg Leu Thr Val Asp Tyr Ser Lys Lys Pro Leu Ser
 1145 1150 1155

Val Asp Thr Thr Phe Arg Lys Gln Phe Gly Gln Arg Leu Ala Ala
 1160 1165 1170

Ile Gly Gln Tyr Leu Glu Gln Lys Phe Gly Ser Ala Gln Asp Val
 1175 1180 1185

Glu Gly Cys Leu Val Gly Lys Asp Ile Phe Ile Val Gln Ser Arg
 1190 1195 1200

Pro Gln Pro
 1205

<210> 5

<211> 12

<212> PRT

<213> Arabidopsis thaliana, Oryza sativa

<400> 5

Leu Pro His Leu Ser His Leu Gly Val Arg Ala Arg
 1 5 10